



**DIANA LUÍSA  
DUARTE DE LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DE  
SOLOS SUJEITOS A DIFERENTES FERTILIZAÇÕES**





**DIANA LUÍSA  
DUARTE DE LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DE  
SOLOS SUJEITOS A DIFERENTES FERTILIZAÇÕES**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Instrumentais de Análise e Controlo de Qualidade Analítica, realizada sob a orientação científica do Dr. Valdemar I. Esteves, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



Ao meu avô...



## **o júri**

presidente

**Doutor Armando da Costa Duarte**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Doutora Maria Teresa Sá Dias de Vasconcelos**  
Professora Catedrática da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**Doutor Valdemar Inocêncio Esteves**  
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Ao meu orientador, Doutor Valdemar Esteves, por me ter proporcionado todas as condições necessárias à realização deste trabalho, pela transmissão dos seus vastos conhecimentos, inteira disponibilidade, bem como pela sua amizade, apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao grupo de Química Analítica e Ambiental, pela ajuda dispensada e apoio sempre que dele necessitei.

Às minhas colegas de Mestrado, pela ajuda e companhia nas longas horas de estudo.

Aos meus colegas de trabalho e amigos, em particular à Luciana, Diana M., Patrícia, Catarina e Sérgio, pelos bons momentos de convívio e pela amizade demonstrada ao longo de todo este percurso.

A todos os meus amigos, pela paciência e compreensão durante a minha ausência nos momentos de maior trabalho, bem como pela força dada nos momentos de desânimo.

Ao meu pai e irmão, pelo incentivo e apoio incondicional.

À minha mãe, pela sua amizade, apoio e esforço, durante toda a minha vida, para que eu pudesse chegar onde cheguei...

Ao Joel, pela presença, apoio e paciência por ter de me ouvir falar de substâncias húmicas vezes sem conta...



## palavras-chave

Fertilizantes, solos, fenóis, RMN de  $^{13}\text{C}$ , FTIR

## resumo

Este trabalho teve como objectivo investigar diferenças estruturais da matéria orgânica presente em solos sujeitos a diferentes tipos de fertilizações. A caracterização e quantificação da matéria orgânica dos diferentes solos foi efectuada utilizando várias técnicas. A electroforese capilar foi utilizada com o intuito de determinar o conteúdo fenólico existente na matéria orgânica natural de cada solo. A principal diferença observada entre os solos diz respeito à proveniência dessa matéria orgânica. Verificou-se que os solos fertilizados com estrumes apresentavam maior conteúdo fenólico, sendo a maior quantidade da matéria orgânica oriunda de plantas angiospérmicas, traduzindo-se numa maior quantidade de fenóis do grupo seringilo. Este facto poderá dever-se à incorporação de palhas, plantas angiospérmicas, neste tipo de fertilizante. A caracterização estrutural da matéria orgânica dos diferentes solos foi efectuada com base na espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de infravermelho. Comparando os resultados obtidos foi possível verificar um maior conteúdo de grupos metileno ( $-\text{CH}_2$ ) no solo fertilizado com composto. Foi também neste solo que se encontraram diversos indícios da existência de uma maior quantidade de proteínas. Os solos que aparentaram maior conteúdo em hidratos de carbono foram os solos fertilizados com composto e com lamas de estações de tratamento de águas residuais municipais. Para além disso, dados do RMN de  $^{13}\text{C}$  sugerem o solo fertilizado com composto como aquele com maior grau de degradação da matéria orgânica. A ideia do solo fertilizado com estrume ser o mais rico em estruturas aromáticas, nomeadamente unidades estruturais seringilo e vanililo das lenhinas, é também sugerida pelos dados obtidos através da espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$ .



**keywords**

Fertilizers, soils, phenols,  $^{13}\text{C}$  NMR, FTIR

**abstract**

The aim of this work was to investigate structural differences of the organic matter present in soils subjected to different types of fertilizations. The characterization and quantification of the organic matter from different soils was accomplished using several techniques. Capillary electrophoresis was used with the purpose of determine the phenolic content present in natural organic matter of each soil. The main difference observed between soils is related to the origin of organic matter. Soils fertilized with farmyard presented a higher content of organic matter derived from angiosperm, expressed by a higher quantity of syringic unities. This fact can be explained by the incorporation of cereal straw in the preparation of this type of fertilizer. Structural characterization of organic matter from different soils was based on  $^{13}\text{C}$  NMR and Infra-Red spectroscopy. Results, when compared, indicate a higher content of methylene groups ( $-\text{CH}_2$ ) and proteins on composted soils. A higher content of carbon hydrates is suggested in soils fertilized with municipal sewage sludge and composted soils. Data from  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy also suggest that compost soils have organic matter with higher maturation degree. The idea mentioned previously, that soil with farmyard manure presents higher aromatic content, namely syringic and vanillic units from lignin, is also suggested by  $^{13}\text{C}$  NMR data.









	Pág.
<b>Apresentação</b>	<b>1</b>
<b>I. Introdução</b>	
FERTILIZANTES ORGÂNICOS E O AMBIENTE.....	3
CARACTERIZAÇÃO DAS FERTILIZAÇÕES DOS SOLOS.....	7
<b>II. Determinação do Conteúdo Fenólico em Matéria Orgânica Natural</b>	
1. OBJECTIVOS.....	9
2. INTRODUÇÃO.....	10
2.1. A Lenhina como Marcador da Origem da Matéria Orgânica.....	10
2.2. Degradação Oxidativa da matéria orgânica com óxido de cobre – Método de Hedges.....	13
2.3. Extracção em Fase Sólida.....	14
2.4. Electroforese Capilar de Zona.....	16
3. OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRACÇÃO UTILIZANDO PADRÕES.....	20
3.1. Metodologia experimental.....	20
3.1.1. Reagentes.....	20
3.1.2. Preparação de soluções.....	20
3.1.3. Metodologia da extracção em fase sólida.....	21
3.1.4. Condições instrumentais de análise.....	22
3.2. Determinação das taxas de recuperação com SPE.....	24
3.2.1. Taxas de recuperação – estudo em padrões individuais com um eluente.....	24
3.2.2. Taxas de recuperação – estudo em padrões individuais eluídos sequencialmente com dois solventes.....	25
3.2.3. Taxas de recuperação – estudo em soluções padrão mistura.....	27
3.3. Conclusão.....	30

---

4. AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRACÇÃO NUMA AMOSTRA REAL.....	31
4.1. Metodologia experimental.....	31
4.1.1. Preparação de soluções e condições experimentais de análise.....	31
4.1.2. Degradação das amostras.....	32
4.1.3. Metodologia da extracção em fase sólida.....	33
4.2. Análise de resultados.....	33
4.2.1. Eficiência do método.....	33
4.2.2. Avaliação da extracção em fase sólida.....	36
4.2.3. Avaliação de todo o método de preparação da amostra.....	38
4.3. Conclusões.....	40
5. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO EM AMOSTRAS DE SOLO SUJEITOS A DIFERENTES FERTILIZAÇÕES.....	42
5.1. Metodologia experimental.....	42
5.2. Análise de resultados.....	43
5.2.1. Percentagem de matéria orgânica.....	43
5.2.2. Solos com fertilização mineral.....	44
5.2.3. Solos fertilizados com lamas de ETAR.....	46
5.2.4. Solos fertilizados com estrume animal.....	49
5.2.5. Solos fertilizados com composto de lixos domésticos.....	51
5.2.6. Comparação dos solos com base no conteúdo em fenóis.....	54
5.3. Conclusões.....	61
<b>III. Análise Termogravimétrica</b>	
1. OBJECTIVOS.....	63
2. INTRODUÇÃO.....	63
3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
<b>IV. Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup>C</b>	
1. OBJECTIVOS.....	77

---

---

2. INTRODUÇÃO.....	77
3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	79
3.1. Tratamento da Amostra.....	79
3.2. Instrumentação.....	79
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.1. Intervalo: 0 – 45 ppm.....	82
4.2. Intervalo: 45 – 60 ppm.....	83
4.3. Intervalo: 60 – 90 ppm.....	83
4.4. Intervalo: 90 – 110 ppm.....	84
4.5. Intervalo: 110 – 140 ppm.....	85
4.6. Intervalo: 140 – 160 ppm.....	85
4.7. Intervalo: 160 – 190 ppm.....	86
4.8. Outras considerações.....	86
5. CONCLUSÕES.....	88
<b>V. Espectroscopia de Infravermelho</b>	
1. OBJECTIVOS.....	91
2. INTRODUÇÃO.....	91
3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	93
3.1. Tratamento da Amostra.....	93
3.2. Instrumentação.....	93
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
4.1. Zona 3600-2500 cm <sup>-1</sup> .....	95
4.2. Zona 1900-900 cm <sup>-1</sup> .....	97
5. CONCLUSÕES.....	99
<b>VI. Conclusões.....</b>	<b>101</b>
<b>VII. Referências.....</b>	<b>105</b>

---





# Índice de Tabelas



## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
Tabela 1 – Tipo de vegetação e monómeros característicos.....	12
Tabela 2 – Definição dos parâmetros da lenhina.....	12
Tabela 3 – Percentagem de recuperação para a vanilina e de composto não retido pelo cartuxo a pH 1 e 7.....	24
Tabela 4 – Resumo das percentagens de recuperação dos compostos eluídos com acetonitrilo e dos compostos não retidos em soluções individuais $2.50 \times 10^{-3}$ M.....	25
Tabela 5 – Percentagens de recuperação e de composto não retido para o ácido ferúlico utilizando uma eluição sequencial com dois eluentes.....	26
Tabela 6 – Percentagens de recuperação dos compostos eluídos sequencialmente com acetonitrilo e metanol e dos compostos não retidos (n=3) em soluções individuais $2.50 \times 10^{-3}$ M.....	27
Tabela 7 – Tempos de migração e intervalo de confiança a 95 % (n=21).....	34
Tabela 8 – Resumo dos parâmetros obtidos para cada recta de calibração.....	35
Tabela 9 – Resumo dos dados de precisão obtidos para cada recta de calibração.....	36
Tabela 10 – Concentrações dos fenóis numa amostra de solo e respectivo RSD (n=3). As diferenças entre réplicas apenas têm em conta o processo de SPE e o método analítico...	38
Tabela 11 – Concentrações dos fenóis numa amostra de solo e respectivo RSD (n=3). As diferenças entre réplicas para além do processo de SPE e do método analítico têm em conta a variabilidade causada pelo processo de degradação com CuO.....	39
Tabela 12 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis da Tabela 11 e respectivo RSD (n=3).....	40
Tabela 13 – Percentagem de matéria orgânica em cada solo analisado e respectivo limite confiança 95 % (n=3), bem como a média e RSD (%) para cada tipo de fertilização.....	43
Tabela 14 – Resultados para cada fenol obtido nos solos sujeitos a uma fertilização mineral e limite de confiança a 95 % (n=6).....	45
Tabela 15 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis em cada solo mineral e limite de confiança a 95 % (n=6).....	45
Tabela 16 – Resumo dos resultados para cada fenol obtido nos solos sujeitos a uma fertilização com lamas e limite de confiança a 95 % (n=6).....	47
Tabela 17 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis em cada solo fertilizado com lamas e limite de confiança a 95 % (n=6).....	48
Tabela 18 – Resumo dos resultados para cada fenol obtido nos solos sujeitos a uma fertilização com estrume e limite de confiança a 95 % (n=6).....	50
Tabela 19 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis em cada solo fertilizado com estrume animal e limite de confiança a 95 % (n=6).....	50

Tabela 20 – Resumo dos resultados para cada fenol obtido nos solos sujeitos a uma fertilização com composto e limite de confiança a 95 % (n=6).....	52
Tabela 21 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis em cada solo fertilizado com composto e limite de confiança a 95 % (n=6).....	52
Tabela 22 – Percentagem relativa de cada fenol presente no solo com limite de confiança a 95 % (n=6).....	54
Tabela 23 – Valores próprios para cada componente principal e respectiva percentagem de variância.....	57
Tabela 24 – Valores dos 3 primeiros componentes principais obtidos para cada amostra .....	59
Tabela 25 – Valores médios das massas de 7 brancos às temperaturas: inicial, a 60 °C e a 750 °C, bem como o desvio padrão e o limite de confiança (LOD = branco+3* desvio padrão)...	67
Tabela 26 – Valores da Humidade a 60 °C e Cinzas a 750 °C dos solos obtidos através da realização de 3 réplicas, bem como o respectivo desvio padrão.....	68





# Índice de Figuras



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1 – Compostos fenólicos obtidos da degradação oxidativa da lenhina .....	11
Figura 2 – Esquema do processo de extracção em fase sólida – fase reversa.....	15
Figura 3 – Representação esquemática da dupla camada eléctrica.....	17
Figura 4 – Sistema de vácuo utilizado na extracção em fase sólida.....	21
Figura 5 – Aparelho de Electroforese capilar utilizado.....	22
Figura 6 – Percentagens de recuperação obtidas para os diferentes fenóis presentes numa solução mistura com concentrações entre $2.50 \times 10^{-4}$ e $2.50 \times 10^{-3}$ M com padrão interno $1.00 \times 10^{-3}$ M.....	28
Figura 7 – Percentagens de composto não retido obtidas para os diferentes fenóis presentes numa solução mistura com concentrações entre $2.50 \times 10^{-4}$ e $2.50 \times 10^{-3}$ M com padrão interno $1.00 \times 10^{-3}$ M.....	29
Figura 8 – Mini-bombas de aço na estufa.....	32
Figura 9 – Electroferograma de uma mistura padrão com concentração $1.00 \times 10^{-3}$ M para o padrão interno e com $2.50 \times 10^{-4}$ M para os outros analitos.....	34
Figura 10 – Recta de calibração obtida para a acetoseringona.....	35
Figura 11 – Electroferograma de uma amostra de solo após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno $5.00 \times 10^{-5}$ M.....	37
Figura 12 – Electroferograma de três amostras de solo com fertilização mineral após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno $5.00 \times 10^{-5}$ M.....	44
Figura 13 – Electroferograma de três amostras de solo fertilizado com lamas de ETAR após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno $5.00 \times 10^{-5}$ M.....	47
Figura 14 – Electroferograma de três amostras de solo fertilizado com estrume de animais após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno $5.00 \times 10^{-5}$ M.....	49
Figura 15 – Electroferograma de três amostras de solo fertilizado com composto após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno $5.00 \times 10^{-5}$ M.....	51
Figura 16 – Percentagem média de cada fenol presente em cada tipo de fertilização (n=3) com a representação da respectiva barra do desvio padrão.....	55
Figura 17 – Representação dos valores S/V vs. C/V de todas as 12 amostras de solo analisadas, bem como os valores para os tecidos de gimnospérmicas lenhosas (G), gimnospérmicas não lenhosas (g), angiospérmicas lenhosas (A) e angiospérmicas não lenhosas (a).....	56
Figura 18 – Representação dos valores próprios - Scree Plot.....	58
Figura 19 – Representação gráfica do CP1 em função do CP2 e do CP3 para cada amostra de solo analisada.....	60
Figura 20 – Aparelho de termogravimetria.....	64
Figura 21 – Programa de temperatura utilizado nas análises termogravimétricas.....	65

Figura 22 – Curvas do programa de temperatura (Temp), termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA) dos três solos sujeitos a fertilização mineral.....	70
Figura 23 – Curvas do programa de temperatura (Temp), termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA) dos três solos sujeitos a fertilização com estrume animal...	71
Figura 24 – Curvas do programa de temperatura (Temp), termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA) dos três solos sujeitos a fertilização com composto.....	72
Figura 25 – Curvas do programa de temperatura (Temp), termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA) dos três solos sujeitos a fertilização com lamas de ETAR...	73
Figura 26 – Máximo dos picos de velocidade de decomposição térmica em função da perda de massa das amostras de solos (média por fertilização; n=3).....	74
Figura 27 – Unidade estrutural da celulose.....	81
Figura 28 – Seringilo (S).....	81
Figura 29 – Guaiacilo (G).....	81
Figura 30 – Espectros de RMN CPMAS de $^{13}\text{C}$ de diferentes solos: solo 6 (fertilizado com lamas), solo 16 (fertilizado com estrume), solo 7 (fertilizado com composto) e solo 2 (fertilização mineral).....	81
Figura 31 – Áreas relativas para cada solo analisado em cada um dos intervalos definidos anteriormente.....	82
Figura 32 – Razão C Alquilo/ O – C alquilo para cada solo.....	87
Figura 33 – Espectros de infravermelho das diferentes amostras de solo.....	94
Figura 34 – Espectros de Infravermelho da região de 3050 a 2800 $\text{cm}^{-1}$ das diferentes amostras de solo.....	96
Figura 35 – Espectros de Infravermelho da região de 1900 a 900 $\text{cm}^{-1}$ das diferentes amostras de solo.....	97



# [ Glossário de Abreviaturas ]



## ABREVIATURAS

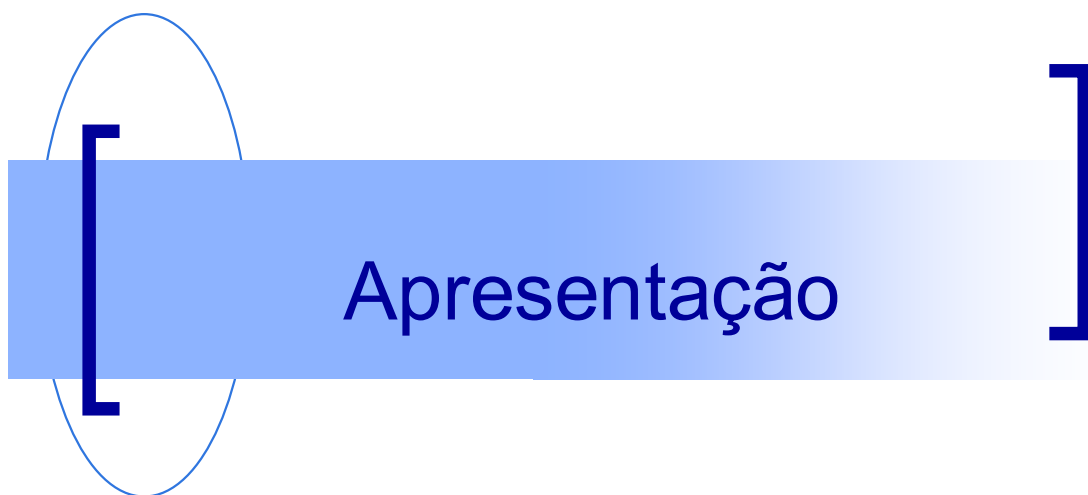
- **(Ad/Al)p** – Razão molar entre o ácido *p*-hidroxibenzóico e o *p*-hidroxibenzaldeído
- **(Ad/Al)s** – Razão molar entre o ácido serínico e o seringaldeído
- **(Ad/Al)v** – Razão molar entre o ácido vanílico e a vanilina
- **AF** – Ácidos Fúlvicos
- **AH** – Ácidos Húmicos
- **C** – Carbono
- **C/N** – Razão Carbono/Azoto
- **C/V** – Razão molar entre os fenóis do grupo Cinamilo e os fenóis do grupo Vanililo
- **COM** – Fertilização com composto (“**Com**post”)
- **CP1** – Componente **P**incipal **1**
- **CP2** – Componente **P**incipal **2**
- **CP3** – Componente **P**incipal **3**
- **CPMAS** – Polarização Cruzada com rotação no ângulo mágico (**C**ross **P**olarization – **M**agic **A**ngle **S**pinning)
- **CZE** – Electroforese capilar de zona (**C**apillary **Z**one **E**lectrophoresis)
- **EOF** – Fluxo electrosmótico (**E**lectro**o**smotic **F**low)
- **ETAR** – Estação de **T**ratamento de Águas **R**esiduais
- **FTIR** – Espectroscopia de Infravermelho com transformadas de Fourier (**F**ourier **T**ransform **I**nfra**R**ed)
- **FYM** – Fertilização com estrume (“**F**armyard **M**anure”)
- **GC** – Cromatografia gasosa (**G**as **C**hromatography)
- **HPLC** – Cromatografia líquida de elevada pressão (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography)
- **IHSS** – Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (**I**nternational **H**umic **S**ubstances **S**ociety)
- **LLE** – Extracção Líquido-líquido (“**L**iquid-liquid **E**xtraction”)
- **MIN** – Fertilização mineral
- **P/(V+S)** – Razão molar entre o total de fenóis do grupo *p*-hydroxilo e a soma dos fenóis do grupo Vanililo e do grupo Seringilo
- **PCA** – Análise de componentes principais (**P**rincipal **C**omponent **A**nalysis)
- **PI** – Padrão **I**nterno
- **PON/P** – Razão molar entre *p*-hydroxiacetofenona e o total de fenóis do grupo *p*-hydroxilo
- **RMN** – Ressonância **M**agnética **N**uclear
- **RSD** – Desvio Padrão Relativo (**R**elative **S**tandard **D**eviation)

- **S/V** – Razão molar entre os fenóis do grupo Seringilo e os fenóis do grupo Vanililo
- **SH** – Substâncias **H**úmicas
- **SLU** – Fertilização com lamas de tratamentos (“Sludge”)
- **SPE** – Extração em fase sólida (Solid phase extraction)









# Apresentação



## APRESENTAÇÃO

O objectivo principal deste trabalho é fazer a caracterização da matéria orgânica de solos que foram, durante um longo período de tempo, sujeitos a diferentes fertilizações controladas.

A presente dissertação encontra-se dividida em 6 capítulos principais. No primeiro capítulo encontra-se uma breve introdução, que refere a importância da avaliação da utilização de diversos fertilizantes no ambiente, bem como a caracterização das amostras que foram sujeitas a diferentes tipos de fertilização. No segundo capítulo, referente à determinação do conteúdo fenólico nas amostras de solo, utilizando a electroforese capilar, encontra-se inicialmente uma breve introdução, seguida da optimização do método de extracção em fase sólida dos fenóis característicos da matéria orgânica natural, utilizando para isso padrões dos compostos em questão. Após a referida optimização, encontra-se a avaliação do método adoptado numa amostra de solo real. Segue-se a sua aplicação em amostras de solo sujeitos a diferentes tipos de fertilização, bem como a respectiva avaliação de resultados. Nos capítulos seguintes, capítulo 3, 4 e 5, comparam-se as termodegradabilidades da matéria orgânica das diferentes amostras de solo e faz-se a caracterização estrutural da referida matéria, com base na Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).

No final desta dissertação encontra-se uma conclusão que relaciona todos os resultados obtidos pelas diferentes técnicas utilizadas, seguida pelas referências utilizadas ao longo do trabalho.









## **FERTILIZANTES ORGÂNICOS E O AMBIENTE**

A agricultura é a actividade que maior área ocupa na superfície da Terra e uma das actividades mais importantes para a maior parte da população mundial. Com o contínuo aumento da população existente na Terra, a agricultura terá de apresentar uma produção suficiente para alimentar e proporcionar qualidade de vida às populações, sendo necessário um incremento na produção. Este aumento deverá ser efectuado de forma sustentável e de modo a garantir a qualidade e a segurança alimentar [2].

Os sistemas de produção intensivos, utilizados para produzir a maior parte dos alimentos a nível mundial, promovem o aparecimento de problemas ambientais, tais como: teores elevados de nitratos nas águas, eutrofização, resíduos de pesticidas, redução da biodiversidade, degradação e erosão dos solos e redução da camada de ozono. Outro aspecto importante a salientar é a alteração climática que se tem vindo a observar devido à presença de CO<sub>2</sub>, proveniente da produção de metano em explorações pecuárias e ao consumo de combustíveis fósseis, poluentes e não renováveis [2].

Torna-se assim necessário desenvolver e utilizar tecnologias que promovam a produção, mas também que mantenham ou melhorem a fertilidade dos solos, assegurem a reciclagem dos nutrientes, conservem a água e a energia e controlem os inimigos das culturas [2].

Os solos são constituídos por uma parte sólida, a matriz, uma parte líquida, a solução do solo, e uma gasosa, denominada atmosfera do solo [3].

A matriz é composta por substâncias minerais e orgânicas. Dentro das substâncias minerais podemos encontrar elementos grosseiros e terra fina, que inclui a areia e a argila. A fracção argilosa, juntamente com a matéria orgânica, é a principal responsável pelas propriedades químicas do solo. A matéria orgânica inclui uma grande variedade de seres vivos, desde bactérias, fungos e actinomicetas, até protozoários e anelídeos, bem como a matéria resultante da sua própria actividade e decomposição. São os organismos do solo, em particular os microrganismos, os responsáveis pela decomposição de resíduos orgânicos, bem como um dos responsáveis pela síntese de moléculas orgânicas de elevada estabilidade, incorporadas nas substâncias húmicas (SH), principal constituinte do húmus e que contribuem para propriedades, tais como a capacidade de retenção de água e nutrientes, e o poder tampão do solo [3].

As SH são as substâncias orgânicas naturais encontradas na natureza em maior quantidade, sendo responsáveis pela maior parte do carbono orgânico presente na terra [40, 41]. Estas substâncias são conhecidas como sendo os componentes mais importantes na absorção da radiação solar [27]. De acordo com o procedimento geral adoptado, as SH podem ser divididas em 3 fracções, baseadas na solubilidade em água: (a) humina, fracção das SH que não são solúveis seja qual for o pH; (b) ácidos húmicos (AH), fracção insolúvel para valores de pH inferiores a 2 e (c) ácidos fúlvicos (AF), fracção solúvel a qualquer valor de pH [40]. Uma vez que estas substâncias constituem a maior parte do conteúdo orgânico nos solos e em águas naturais, desempenham um papel fundamental no ciclo geoquímico global do carbono sendo também importantes nas interacções com os xenobióticos já que podem modificar a absorção e toxicidade destes compostos, afectando o destino dos poluentes no ambiente [40].

Para que a produção agrícola seja possível são necessários nutrientes minerais e água nos solos [2]. No entanto, quando se verificam deficiências em substâncias vitais à sobrevivência dos vegetais é comum aplicarem-se fertilizantes orgânicos ou minerais [1, 3].

Os fertilizantes orgânicos mais utilizados são os estrumes, os bio sólidos e os compostos [3].

Os estrumes correspondem a dejectos de animais, apresentando azoto e fósforo sobretudo em formas orgânicas, embora grande parte do azoto presente na urina, nas formas de ureia e de ácido úrico, se transforme rapidamente em amoníaco/ião amónio [3].

Os compostos ou compostados correspondem a resíduos orgânicos sujeitos a uma digestão aeróbia, de modo a estabilizá-los, prevenindo odores desagradáveis e destruindo microrganismos patogénicos. A fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos e as lamas de tratamentos de esgotos são frequentemente compostadas [3].

Os bio sólidos, por sua vez, incluem lamas de tratamento de esgotos, lamas celulósicas resultantes da indústria do papel e resíduos orgânicos de agro-indústrias, de composição e natureza variável [3]. A utilização dos solos como local de destino das lamas tem vindo a ser cada vez mais frequente, devido ao facto de serem ricas em azoto e fósforo e apresentarem baixas razões C/N [5], sendo também uma forma de resolução do problema de eliminação desses produtos [4]. Outros aspectos justificam o interesse pela utilização de lamas na agricultura. De entre os principais factores, encontram-se:

- a) sob o ponto de vista do agricultor: a mais valia, em termo agrários, da utilização de lamas como fertilizante, devido seu elevado conteúdo em matéria orgânica, originando um efeito positivo nas características de agregação do solo e fornecimento de nutrientes às culturas [6].
- b) Sob o ponto de vista da entidade gestora da ETAR: a possibilidade de garantir o escoamento de um resíduo poluente sem encargos (no caso de cedência gratuita) ou em condições geradoras de receitas (no caso de venda de lamas) [4].

Apesar do uso em terrenos agrícolas parecer ser o destino natural de lamas, deverão ser igualmente conhecidos os riscos destas aplicações, não apenas em termos agrários (eventual redução da qualidade e da quantidade das produções obtidas, associada à diminuição do potencial produtivo do solo), mas também e, sobretudo, em termos ambientais e de saúde pública [4]. O efeito da aplicação das lamas nos solos tem sido largamente estudado, apresentando efeitos positivos nas propriedades físicas, químicas e biológicas [5]. No entanto, como produto final de um tratamento de águas residuais, as lamas acumulam muitas substâncias orgânicas que não são degradadas durante o tratamento e que se encontravam presentes nessas águas [5]. Estas fracções apresentam origens quer biogénicas, quer não biogénicas (compostos orgânicos clorados, ftalatos, hidrocarbonetos derivados do petróleo, entre outros) [5]. Esta última fracção representa uma classe de compostos orgânicos com a qual se deverá ter um cuidado acrescido, para que a contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas e até da própria atmosfera, seja evitada [4]. Os metais, por seu lado, são também compostos com os quais se deverá ter um cuidado especial, uma vez que poderá ocorrer uma incorporação desses metais pelas raízes das plantas, provocando um potencial risco para a saúde humana [42].

As substâncias húmicas, constituintes importantes da matéria orgânica quer dos solos, quer dos fertilizantes orgânicos, desempenham um papel relevante no que diz respeito às características dos solos, influenciando as suas propriedades físicas, químicas e biológicas [5]. Não devemos, portanto, esquecer que a natureza e o conteúdo relativo das substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) podem variar, consideravelmente, com o tipo de fertilização orgânica utilizada [5]. Por exemplo, ácidos húmicos provenientes de composto são, geralmente, caracterizados por conterem derivados da lenhina e fracções alifáticas, enquanto que se forem provenientes de lamas de tratamento de esgotos

domésticos apresentam maioritariamente moléculas alifáticas, como ácidos gordos e esteróides, e material proteico. Estas características conferem propriedades diferentes quando são aplicados aos solos [5]. Segundo alguns autores, a aplicação de lamas aos solos aumenta o conteúdo de substâncias húmicas nos solos, mas existem diferenças óbvias entre as propriedades de solos naturais e dos solos derivados de fertilizações com lamas [5, 6].

Ainda é pouco abundante a informação disponível sobre modificações observadas na matéria orgânica devido à utilização de fertilizações orgânicas, particularmente no que diz respeito às substâncias húmicas. Assim, torna-se importante o estudo das consequências da aplicação de diversos tipos de fertilizantes em solos agrícolas, através de um estudo comparativo de solos fertilizados com adubos inorgânicos e com diferentes tipos de resíduos orgânicos domésticos e industriais.

## **CARACTERIZAÇÕES DAS FERTILIZAÇÕES DOS SOLOS**

As amostras utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Agrikulturchemisches Institut, Universidade de Bona (Alemanha), e resultam de terrenos sujeitos a fertilizações controladas desde 1959.

O campo agrícola utilizado encontra-se localizado em Meckenheim, cerca de 15 km a sudeste de Bona, a 170 m acima do nível do mar. A precipitação média anual é de 620 mm/m<sup>2</sup>. O solo é constituído por 6.9 % de areia, 77.1 % de silte e 16.0 % de argila. A fracção mineral argilosa consiste em 5 % de esmectite, 16 % de vermiculite, 69 % de ilite e 10 % de caulinite.

O estudo destes solos começou em 1959, tendo como principal objectivo um teste sobre a utilização de diferentes tipos de fertilizações orgânicas na agricultura. Os campos foram sujeitos a uma sequência de cultivo típica para a região em causa, sendo a história de cultivo dos últimos 10 anos a seguinte:

- 1996, 1998, 2000, 2002, 2004: trigo
- 1997, 2003: beterraba
- 1999, 2005: cevada
- 2001: milho

O campo, com cerca de 980 m<sup>2</sup> de área, foi inicialmente dividido em parcelas, tendo sido cada uma fertilizada com diferentes tipos de fertilizações orgânicas, entre as mais comuns na agricultura. As variantes foram: Composto (COM) – produtos de compostagem de lixos domésticos, Lamas de estações de tratamentos de águas residuais municipais (SLU) e estrumes animais (FYM). Um controlo sem fertilização orgânica, mas sujeito a fertilização mineral (MIN) foi também incluído.

As doses mais baixas aplicadas reflectem o limite legal permitido na Alemanha actualmente (5 t/ha para a SLU, 30 t/ha para a COM e 4.5 t/ha para a FYM desde 1999). Foram também efectuados testes com o dobro e quatro vezes a dose permitida, originando

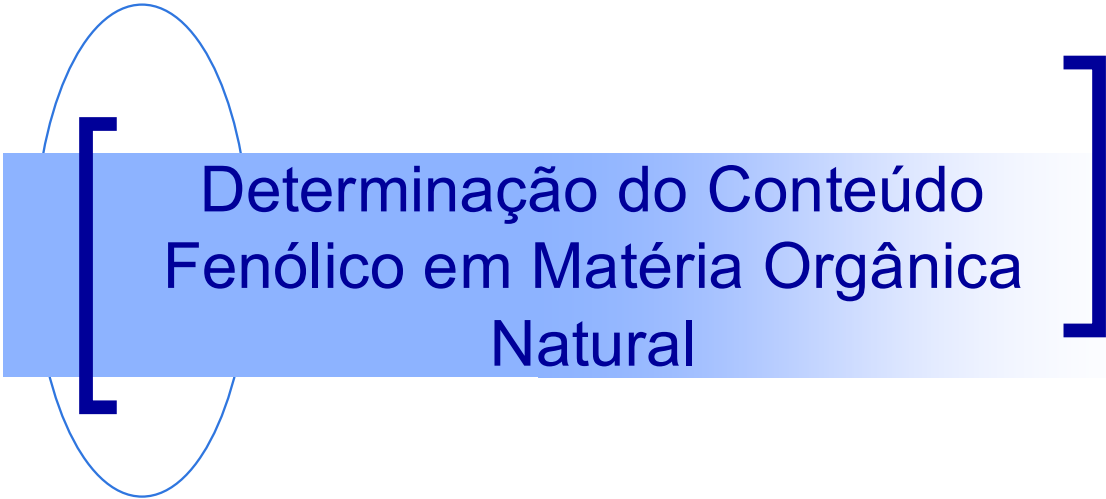
um total de 10 variáveis. Uma vez que se efectuaram 4 réplicas, obtemos 40 talhões com tamanho de  $24.5 \text{ m}^2$ . A escolha dos talhões para as diferentes fertilizações foi aleatória no primeiro ano, tendo sido mantido nos anos seguintes.

Para o estudo em questão apenas foram utilizadas 3 réplicas das amostras de solo onde foram aplicadas a maior dose de fertilizantes orgânico e 3 réplicas da fertilização mineral, tendo resultado em 12 amostras. A colheita das amostras foi efectuada na camada superior (0-30 cm) de cada parcela, foram deixadas secar ao ar e, posteriormente, peneiradas por um peneiro de 2 mm de porosidade. As amostras utilizadas encontram-se identificadas por um número, sendo no caso da fertilização mineral (MIN) a amostra 2, 29 e 37, da fertilização com estrume (FYM) 16, 27 e 39, da fertilização com lamas (SLU) 6, 23 e 33 e no caso da fertilização com composto (COM) 7, 19 e 24.









# Determinação do Conteúdo Fenólico em Matéria Orgânica Natural



## **1. OBJECTIVOS**

Esta componente do trabalho tem como principal objectivo a análise do conteúdo fenólico da matéria orgânica de cada amostra de solo, sujeita a diferentes fertilizações.

Foi efectuada uma alteração do processo de determinação dos fenóis derivados da degradação da lenhina segundo Hedges (1982), no passo em que é utilizada a extracção líquido-líquido. Essa extracção com éter dietílico apresentava elevadas perdas de amostra, resultando numa variabilidade demasiado elevada. Assim, adoptou-se um método de extracção alternativo, que substitui o método usualmente utilizado, garantindo uma maior capacidade de extracção e maior reprodutibilidade. A optimização do método fez-se utilizando padrões dos compostos fenólicos em estudo e, seguidamente, testando o método numa amostra de solo.

Por último, efectuou-se a determinação quantitativa de cada composto fenólico, após uma degradação oxidativa com óxido de cobre, de diferentes amostras de solo sujeitas a fertilizações controladas. Pretende-se com este estudo identificar diferenças no conteúdo fenólico dos solos que possam ser atribuídas ao tipo de fertilização a que foram sujeitos.

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1. A Lenhina como Marcador da Origem da Matéria Orgânica

A lenhina é uma macromolécula fenólica encontrada nas paredes celulares das plantas vasculares, sendo um importante contributo para as substâncias húmicas [8].

A lenhina é constituída por unidades de fenol metoxiladas, que se encontram covalentemente ligadas, formando uma estrutura ramificada heterogénea [9]. A sua estrutura heteropolimérica, constituída por várias subunidades, entre as quais as unidades seringílicas, vanílicas e cinâmicas, tornam a lenhina de difícil acesso à maior parte dos microrganismos, originando um polímero relativamente estável [8, 10]. A degradação da lenhina por fungos é considerada a forma mais importante de bio reciclagem da lenhina, através de um mecanismo de oxidação das cadeias laterais, de propil-desmetilação dos grupos metoxilo (nas posições 3 e/ou 5) e quebra do anel aromático [11].

Devido a estas características, a lenhina torna-se um marcador da presença da matéria orgânica proveniente de plantas vasculares adequado para a distinção quimiotaxonómica deste tipo de plantas [11]. O crescente interesse nas variações ambientais do passado tornou importante o desenvolvimento de métodos fiáveis e precisos, para a identificação dessas variações relacionadas com as mudanças dos tipos de vegetação [8]. No entanto, os polímeros da lenhina nos tecidos das plantas, solos e sedimentos não são fáceis de caracterizar numa análise química directa.

Métodos degradativos são largamente aplicados a macromoléculas naturais, de modo a obter informação específica sobre a sua composição estrutural, através da sua cisão em subunidades individuais mais simples [12]. A oxidação alcalina com óxido de cobre é um método analítico de análise da lenhina ao nível molecular que tem sido largamente aplicado na última década [11]. Durante esta degradação, as ligações C-C alifáticas-alifáticas e alifática-aromáticas são oxidadas, despolimerizando a lenhina e produzindo monómeros fenólicos [11]. O mecanismo de degradação exacto da oxidação com CuO não está completamente percebido, mas inclui a hidrólise alcalina de ligações éster e éter, oxidação de cadeias alifáticas insaturadas e a oxidação de cadeias laterais alquilo de diferentes constituintes aromáticos [12].

A oxidação da matéria orgânica com óxido de cobre origina centenas de produtos de oxidação, dos quais apenas alguns são característicos da lenhina [13]. Estes onze produtos característicos (Figura 1) podem ser agrupados em 4 famílias estruturais, de acordo com os grupos substituintes do anel benzênico: vanililo (também chamado guaiacilo, com os substituintes 4-hidroxi-3-metoxi), seringilo (com os substituintes 4-hidroxi-3,5-dimetoxi), *p*-hidroxilo e cinamilo (em que um dos substituintes é o ácido *trans*-propenóico) [7,10].

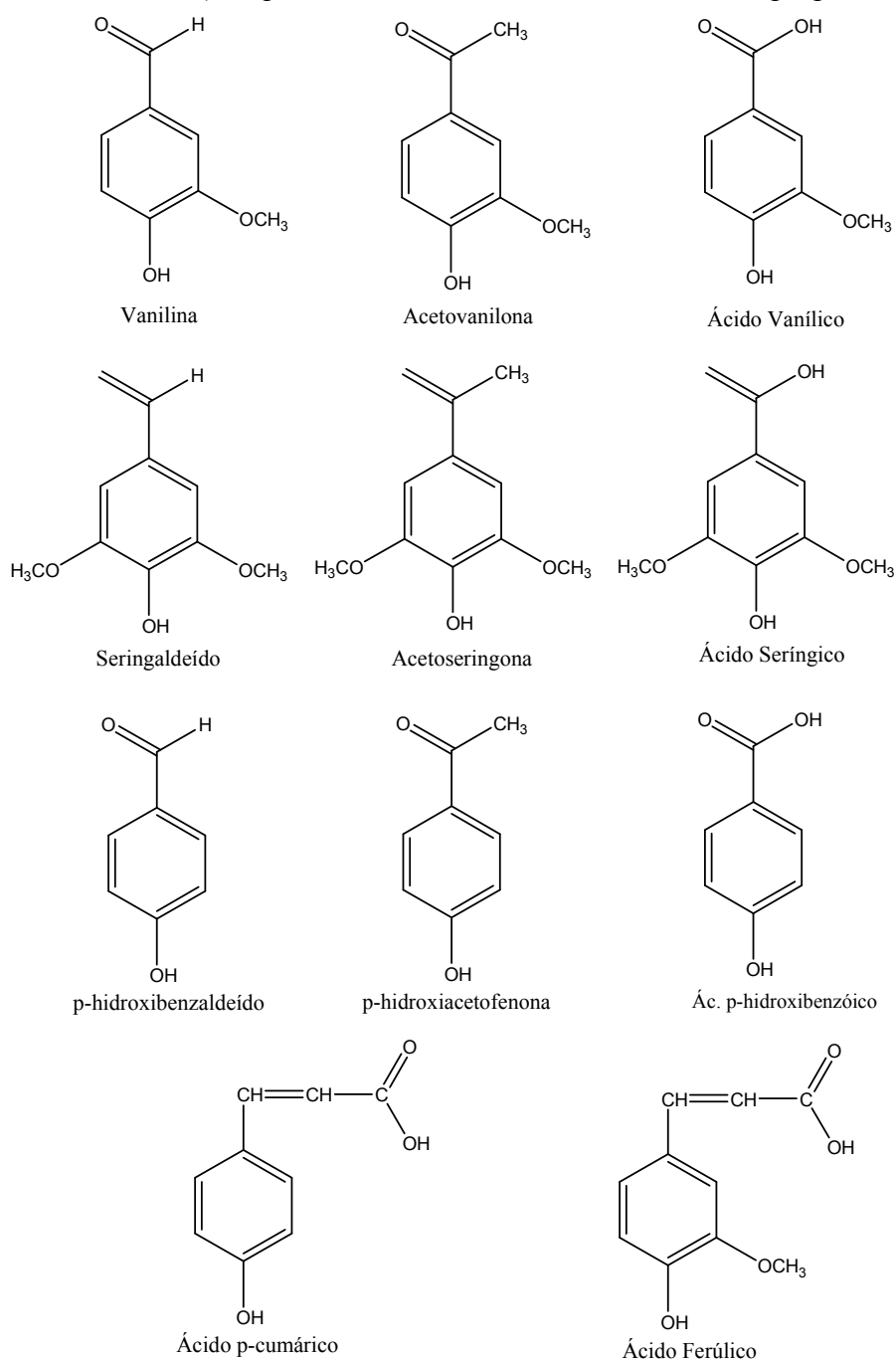


Figura 1 – Compostos fenólicos obtidos da degradação oxidativa da lenhina

Além destes grupos, nas famílias *p*-hidroxilo, vanililo e seringilo, os fenóis têm cadeias laterais de aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos no carbono 1. A família cinamilo é constituída por 2 compostos fenólicos: o ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) e o ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico) [14].

Na tabela 1 encontram-se os compostos fenólicos agrupados segundo a taxionomia das plantas, usados para identificar tecidos lenhosos de tecidos herbáceos, de plantas gimnospermas e angiospermas.

Tabela 1 – Tipo de vegetação e monómeros característicos

Fenóis	Plantas Lenhosas		Plantas Herbáceas	
	Gimnospermas	Angiospermas	Gimnospermas	Angiospermas
Vanililo	✓	✓	✓	✓
Seringilo	✗	✓	✗	✓
Cinamilo	✗	✗	✓	✓

As plantas lenhosas gimnospermas produzem apenas fenóis do grupo vanililo, enquanto que as plantas angiospermas contêm monómeros da família vanililo e seringilo [8]. Os tecidos herbáceos destes dois grupos de plantas contêm ainda monómeros da família cinamilo (que não se encontram presentes em tecidos lenhosos) [8]. Hedges et al. (1988) verificaram que a *p*-hidroxiacetofenona deriva predominantemente da lenhina, enquanto que tecidos não lenhosos libertam prioritariamente *p*-hidroxibenzaldeído e ácido *p*-hidroxibenzóico [32].

A interpretação dos resultados da análise dos compostos, resultantes da oxidação da lenhina, é feita utilizando um conjunto de parâmetros definidos na Tabela 2 [11].

Tabela 2 – Definição dos parâmetros da lenhina

Parâmetro	Definição
PON/P	Razão molar entre <i>p</i> -hidroxiacetofenona e o total de fenóis do grupo <i>p</i> -hidroxilo
P/(V + S)	Razão molar entre o total de fenóis do grupo <i>p</i> -hidroxilo e a soma dos fenóis do grupo vanililo e do grupo seringilo
S/V	Razão molar entre os fenóis do grupo seringilo e os fenóis do grupo vanililo
C/V	Razão molar entre os fenóis do grupo cinamilo e os fenóis do grupo vanililo
(Ad/Al) <sub>p</sub>	Razão molar entre o ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico e o <i>p</i> -hidroxibenzaldeído
(Ad/Al) <sub>v</sub>	Razão molar entre o ácido vanílico e a vanilina
(Ad/Al) <sub>s</sub>	Razão molar entre o ácido seringico e o seringaldeído

O parâmetro S/V pode ser utilizado para discriminar a matéria orgânica proveniente das plantas gimnospermicas (baixa razão S/V, valor próximo de zero), que originam quase exclusivamente fenóis da família vanililo, e angiospermicas (elevada razão S/V, superior a 1) que além de fenóis da família vanililo originam compostos da família seringilo [8]. Por outro lado, o parâmetro C/V é útil para discriminar tecidos lenhosos e tecidos herbáceos, uma vez que os compostos da família cinamilo só são relativamente abundantes nos tecidos herbáceos [10]. As razões de ácido/aldeído de cada família são parâmetros utilizados como indicadores do estado de degradação da matéria orgânica [16]. A representação gráfica de S/V em função de C/V permite avaliar a contribuição dos diferentes grupos de plantas vasculares nas amostras [8].

No que diz respeito à técnica analítica utilizada na quantificação dos compostos fenólicos obtidos, as mais comuns são a cromatografia gasosa (GC), como no caso do trabalho de Hedges and Ertel (1982) e Tareq et al. (2004), e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usada por Štěrbová et al. (2004), Sjöberg et al. (2004) e Lobbes et al. (1999). Estas técnicas apresentam problemas quer de sensibilidade, quer pelo facto de requererem procedimentos experimentais demorados, como é o caso da derivatização necessária para a análise por GC. Por estes motivos, a electroforese capilar de zona (CZE) tem vindo a tornar-se um método analítico cada vez mais aplicado na determinação deste tipo de compostos [14, 24]. A principal vantagem da CZE é o seu elevado poder resolvente, levando a que seja possível uma rápida e bem resolvida separação de compostos semelhantes, apenas ajustando os principais parâmetros que afectam o comportamento electroforético, como é o caso da concentração iónica do electrólito, pH, potencial aplicado e temperatura [24-26]. Uma grande vantagem desta técnica é a pequena quantidade necessária para que a análise seja efectuada (volume de alguns microlitros) [27].

### **2.2. Degradação Oxidativa da Matéria Orgânica com óxido de cobre – Método de Hedges**

A degradação oxidativa com óxido de cobre, segundo Hedges and Ertel (1982), consiste na degradação de uma amostra colocada numa mini-bomba, juntamente com

óxido de cobre e  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em meio básico, submetida a 170 °C durante 3 horas. Os conteúdos das mini-bombas são depois lavados com hidróxido de sódio 1 M, acidificados e centrifugados. Os extractos obtidos são então sujeitos a uma extracção, de modo a obterem-se os compostos fenólicos pretendidos.

Uma das técnicas utilizadas para efectuar a extracção dos compostos fenólicos, obtidos depois da degradação oxidativa com óxido de cobre, é a extracção líquido-líquido (LLE) com dietil éter, extracção utilizada por Hedges and Ertel (1982). No entanto, a extracção em fase sólida (SPE) apresenta várias vantagens quando comparada com a LLE, tais como a utilização de pequenos volumes de solventes, reduzidos tempos operacionais, possibilidade de miniaturização, elevada reprodutibilidade e possibilidade de preparação de várias amostras em simultâneo [30]. As fracções fenólicas já foram isoladas utilizando cartuxos de fase reversa em vinhos por Guillén, D.A. et al. (1997), em azeite por Mateos, R. et al. (2001) e em cervejas sem álcool por Garcia, A.A. et al. (2004).

### **2.3. Extracção em Fase Sólida**

A extracção em fase sólida é uma técnica de preparação de amostras cuja importância tem vindo a crescer significativamente. É um método excelente de extracção, concentração e limpeza de amostras. Com esta técnica muitos dos problemas associados à extracção líquido-líquido podem ser evitados, tais como: a separação incompleta de fases, recuperações demasiado baixas, a utilização de material de vidro caro e a utilização de elevadas quantidades de solventes orgânicos. A técnica SPE torna-se mais eficiente, podendo até ser automatizada, conseguindo reduzir-se, quer o tempo de análise, quer os volumes de solventes utilizados [28].

O tipo de resina utilizada na extracção em fase sólida pode ser de fase normal ou fase reversa, podendo o analito em estudo ser retido pelo sorbente de duas formas: adsorção ou troca iónica. A técnica de SPE em fase reversa baseia-se numa separação que envolve um analito numa matriz polar ou moderadamente polar (fase móvel) e uma fase estacionária apolar (adsorbente). O analito de interesse encontra-se entre o medianamente polar e o não polar ou apolar. As interacções presentes neste tipo de separação são hidrofóbicas: interacções apolar-apolar ou forças de dispersão de van der Waals. Os cartuxos utilizados



em fase reversa apresentam grupos silanol hidrofílicos, na superfície de empacotamento de sílica, modificados quimicamente através da ligação a grupos funcionais hidrofóbicos. A retenção dos analitos orgânicos presentes em soluções polares (como por exemplo, a água) ao adsorbente deve-se, primordialmente, a forças atractivas entre a ligação carbono – hidrogénio do analito e os grupos funcionais na superfície da sílica. Para eluir um composto adsorbido numa fase reversa, deverá utilizar-se um solvente não polar, que seja capaz de romper a ligação entre o analito e o adsorbente.

A extracção em fase sólida é um processo que envolve, geralmente, cinco passos: a escolha do sorbente mais adequado, o acondicionamento do cartuxo, a adição da amostra, a lavagem do cartuxo e a eluição dos compostos de interesse (Figura 2).

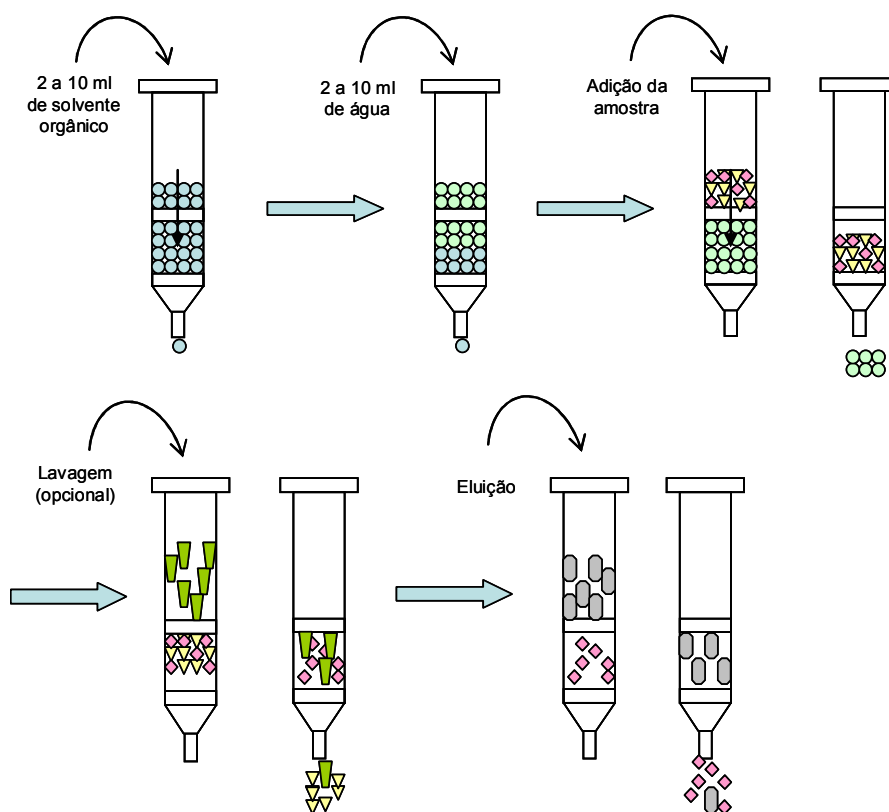


Figura 2 – Esquema do processo de extracção em fase sólida – fase reversa

Depois de escolhido o cartuxo adequado, efectua-se o acondicionamento que, no caso da utilização de uma fase reversa, consiste na passagem de 2 a 10 ml de solvente orgânico, seguida da passagem de água. O solvente orgânico, como por exemplo o metanol, molha a superfície do sorbente, penetrando nas fases alquil ligadas, permitindo, dessa forma, que a água molhe a sílica de uma forma eficiente. O terceiro passo consiste na passagem da

amostra que pode ir de microlitros a alguns litros. Se o volume a passar pela coluna for demasiado grande poderá originar uma redução na taxa de recuperação. O passo de lavagem do cartuxo é opcional, tendo como objectivo remover impurezas, que possam igualmente ficar retidas e serem co-eluídas com o analito. Desta forma, poderá utilizar-se um solvente que não remova o analito, mas sim as impurezas. Em seguida, faz-se a eluição dos compostos de interesse, normalmente efectuado com um volume reduzido de um solvente adequado ao composto em causa [28].

### **2.4. Electroforese Capilar de Zona**

A electroforese capilar é uma família de técnicas que utilizam tubos capilares (10 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno) para obter uma alta eficiência de separação, quer de macromoléculas, quer de moléculas pequenas [29]. A electroforese é um método de separação que se baseia nas diferenças entre as taxas de migração de espécies carregadas, presentes numa solução tampão, quando submetidas a um campo eléctrico. A electroforese capilar de zona é um dos modos de electroforese capilar em que o mecanismo de separação se baseia nas diferenças da razão carga-massa.

A configuração instrumental básica para a electroforese capilar é relativamente simples: um capilar de sílica fundida com uma janela óptica, uma fonte de energia de alta voltagem controlável, dois eléctrodos, dois reservatórios para os tampões e um detector. As extremidades do capilar são colocadas nos reservatórios de tampão e a janela óptica é alinhada com o detector (UV). Depois de encher o capilar com a solução tampão, substitui-se um dos reservatórios do tampão pelo da amostra a injectar no capilar. Existem duas formas diferentes de injectar a amostra, quer por injeção hidrodinâmica, onde a amostra é injectada usando a aplicação de uma pressão, quer por injeção electrocinética, baseada no facto de que quando se aplica uma voltagem a amostra é introduzida no capilar devido à mobilidade electroforética. A quantidade de amostra injectada é controlada variando quer a pressão/voltagem, quer o tempo de injeção. Na extremidade do capilar, oposta à da injeção, é colocado um detector, normalmente UV-VIS ou de fluorescência. A resposta do detector em função do tempo de migração dá origem ao electroferograma. Se forem utilizados capilares de sílica sem revestimento, como acontece na maioria dos casos,

verificam-se dois acontecimentos electrocinéticos: a electroforese dos iões e a electroosmose, descrita como o movimento de um líquido relativamente a uma superfície fixa carregada, devido à aplicação de um campo eléctrico [58]. De facto, a electroosmose é um fenómeno inerente a um sistema de duas fases, uma estacionária sólida e uma móvel líquida, existindo entre elas uma dupla camada eléctrica, e onde, sob um potencial eléctrico aplicado, uma se move em relação à outra. A formação desta dupla camada, entre a superfície sólida e a solução, é de importância fundamental [59]. A superfície dos capilares de sílica é formada por grupos silanol Si-O-H que se comportam esquematicamente da seguinte forma:



cuja constante de dissociação pode ser caracterizada por  $\text{p}K_{\text{SiOH}} < 2$ . Assim, em capilares de sílica com soluções aquosas, os grupos silanol presentes na superfície formam a parte fixa negativa da dupla camada eléctrica. Como se pode ver na Figura 3, os iões positivos ligam-se à superfície negativa e os negativos são repelidos. Uma fracção dos catiões da dupla camada eléctrica, que formam o electrólito, está sempre fixa por forças electrostáticas, perto da parede do capilar, e forma a camada de Stern, o resto dos catiões formam uma camada difusa móvel carregada [59].

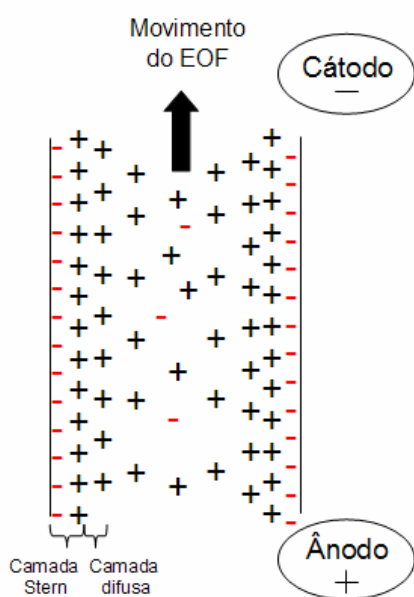


Figura 3 - Representação esquemática da dupla camada eléctrica

Aplicando uma voltagem ao capilar, os catiões na porção difusa da dupla camada migram na direcção do cátodo, transportando com eles água. O resultado é um fluxo efectivo de solução tampão na direcção do eléctrodo negativo, fluxo electrosmótico (EOF). Perante a existência deste fluxo, o ião positivo é o primeiro a passar no detector, chegando mais rapidamente do que na ausência do EOF. A partícula neutra, na ausência de EOF não iria efectuar qualquer movimento, no entanto, perante a existência deste fluxo, mover-se-á à mesma velocidade que os iões do EOF, pois são arrastadas por ele. No entanto, e uma vez que o modo de separação deste tipo de electroforese se baseia na razão carga-massa, as partículas neutras de diferentes espécies não são separadas e atingem o detector todas ao mesmo tempo, formando apenas uma banda. No caso dos iões negativos, na ausência de EOF não passariam pelo detector, no entanto, na sua presença duas situações podem ocorrer: se a velocidade do fluxo for suficientemente elevada, as partículas atingem o detector depois das outras partículas (tempo de migração superior), por outro lado, se as forças electrostáticas, que atraem as partículas negativas para o pólo contrário ao do detector, forem superiores ao EOF, estas nunca atingem o pólo negativo, não chegando a ser detectadas.

O EOF é definido por:

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} E \quad (\text{II-2})$$

onde  $\varepsilon$  é a constante dieléctrica (depende do solvente em questão),  $\zeta$  é o potencial zeta, potencial da dupla camada difusa,  $\eta$  a viscosidade e  $E$  o campo eléctrico aplicado [58].

Como se pode ver pela equação II-2, a velocidade do fluxo electrosmótico depende do potencial zeta, que por sua vez, depende de outros parâmetros, tais como a força iónica e o pH. Assim, se aumentarmos a força iónica, diminuimos o potencial zeta e, consequentemente, a velocidade do EOF. O aumento da força iónica, ou seja, aumento da concentração do electrólito, origina um aumento de iões na camada rígida e uma diminuição da camada difusa. É esta diminuição da camada difusa a responsável pela diminuição do potencial zeta e, consequente, diminuição da velocidade do EOF. O pH também influencia o potencial zeta, uma vez que o aumento do pH, aumenta também as cargas ionizadas na superfície do capilar, originando o aumento do potencial zeta. A partir

de um dado valor de pH, os grupos silanol que revestem o capilar já se encontram todos ionizados, não havendo aumento da velocidade do EOF, devido ao incremento do pH [58]. Para além do potencial zeta, a viscosidade também influencia a velocidade do EOF. Assim, a diminuição da viscosidade, através do aumento da temperatura, faz aumentar o EOF. Por este motivo, o controlo da temperatura deverá ser conseguido durante a toda a análise. No entanto, durante a própria análise existe geração de calor – Efeito de Joule – que, por sua vez, provoca alteração da velocidade do EOF e, consequentemente, variações nos tempos de migração dos analitos em estudo. A quantidade de calor gerado é proporcional ao quadrado da intensidade do campo eléctrico. Este calor gerado é dissipado por difusão através das paredes do capilar, usualmente termostatizadas. No entanto, a dissipação do calor por difusão origina gradientes de temperatura, sendo a temperatura superior no centro que junto às paredes do capilar. Este gradiente de temperatura origina velocidades de EOF diferentes através da secção do capilar que, consequentemente, provoca um alargamento das bandas dos analitos. Por este motivo, o efeito de Joule deverá ser reduzido. Esta redução é conseguida de diversas formas: diminuindo a intensidade da corrente eléctrica, aumentando o comprimento do capilar ou até diminuindo o diâmetro do capilar. No entanto a diminuição da intensidade da corrente, bem como o aumento do comprimento do capilar, aumentam os tempos de análise. Por outro lado, com a diminuição do diâmetro do capilar obtemos uma janela óptica de detecção menor e, desta forma, perdemos sensibilidade [58]. Assim, é necessário escolher as condições mais adequadas ao estudo em questão, conseguindo atingir um equilíbrio entre todos os parâmetros envolvidos.

### 3. OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRACÇÃO UTILIZANDO PADRÕES

A primeira etapa da parte experimental, relacionada com a determinação do conteúdo fenólico existente nas amostras de solo, sujeitas a diferentes tipos de fertilização, consistiu na optimização da metodologia de extracção, escolhida para substituir a comum extracção líquido-líquido utilizada. Para optimizar este processo, começou-se por efectuar a passagem de diferentes soluções padrão, pelos cartuxos de SPE escolhidos, de modo a poder-se escolher o eluente ou eluentes mais adequados. Essa escolha foi feita em função das taxas de recuperação de cada composto, quando presente numa solução individual. Foram ainda avaliadas as competições pelos locais de adsorção, dos diversos compostos, em soluções conjuntas de diferentes concentrações. Estas recuperações foram determinadas baseando-se na comparação das áreas dos padrões antes e depois do SPE.

#### 3.1. Metodologia experimental

##### 3.1.1. Reagentes

Para a execução deste trabalho experimental, foram utilizados os seguintes reagentes químicos, para a preparação de soluções padrão: Etilvanilina (99%, Aldrich), Acetoseringona (97%, Aldrich), Acetovanilona (98%, Aldrich), Seringaldeído (99%, Aldrich), *p*-hidroxiacetofenona (99%, Aldrich), Vanilina (99%, Merck), Ácido Serínico (98%, Sigma), Ácido Ferúlico (99%, Aldrich), *p*-hidroxibenzaldeído (99%, BHD), Ácido *p*-cumárico (98%, Sigma), Ácido Vanílico (97%, Aldrich) e Ácido *p*-hidroxibenzóico (99%, Aldrich). Na preparação do electrólito para a electroforese capilar foram utilizados o  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  e o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ambos da Riedel-deHäen, bem como acetonitrilo da Lab-Scan (p.a.).

##### 3.1.2. Preparação de soluções

Foram preparadas soluções individuais (100 ml) de cada um dos 11 padrões: *p*-hidroxibenzaldeído, *p*-hidroxiacetofenona, *p*-hidroxibenzóico, vanilina, acetovanilona, ácido vanílico, seringaldeído, acetoseringona, ácido serínico, ácido *p*-cumárico e ácido

ferúlico, bem como do padrão interno (PI), etilvanilina. As soluções com concentração  $1.00 \times 10^{-2}$  M foram obtidas dissolvendo os sólidos pesados numa pequena quantidade de acetonitrilo e perfazendo o volume com água ultra pura, obtida de um sistema Milli-Q da Millipore (Millipore Q plus 185). As soluções padrão intermédias, utilizadas para testar a extracção em fase sólida, foram preparadas por diluição das soluções-mãe com água ultra-pura, acidificada a pH 1 com HCl 3 M, de modo a obter-se uma solução fenólica que simulasse o pH das amostras.

### 3.1.3. Metodologia da extracção em fase sólida

A separação em fase reversa envolve uma matriz polar ou moderadamente polar (normalmente aquosa) – a fase móvel – e uma fase estacionária não polar ou apolar. O cartuxo de SPE utilizado apresenta uma superfície modificada com um polímero, originando um maior número de locais de ligação, que melhoram a capacidade de retenção de analitos polares e aromáticos.

Todo o processo de extracção em fase sólida foi efectuado utilizando cartuxos com 500 mg de C18 modificada, strata-X da phenomenex Inc., e um sistema de vácuo adequado, como o apresentado na Figura 4.



Figura 4 – Sistema de vácuo utilizado na extracção em fase sólida

Fez-se o acondicionamento do cartuxo utilizando a seguinte sequência [22]:

- passagem de 2 ml de acetonitrilo
- passagem de 2 ml de metanol
- passagem de 2 ml de água

Em seguida efectuou-se uma breve secagem do cartuxo através da passagem de ar. Após o acondicionamento, efectuou-se a passagem dos diversos padrões. O volume escolhido para testar a recuperação nestes cartuxos foi de 40 ml, volume que se espera obter após a degradação oxidativa das amostras. Desta forma, 40 ml de cada padrão foi passado por cada cartuxo e eluído com 2.5 ml de acetonitrilo. No entanto, de forma a melhorar a recuperação de cada padrão, testou-se a eluição com 2.5 ml de acetonitrilo seguido de 2.5 ml de metanol.

### 3.1.4. Condições instrumentais de análise

A técnica de análise escolhida foi a electroforese capilar de zona (Figura 5), utilizando um capilar com 50 cm de comprimento (44 cm até ao detector), 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo, tendo sido removido cerca de 1 mm do revestimento de poli-imida nas extremidades do capilar, de modo a melhorar a estabilidade da linha de base. Outra solução adoptada, também com o intuito de melhorar a estabilidade da linha de base, através da diminuição do ruído, foi o polimento das pontas do capilar com uma placa de cerâmica.



Figura 5 – Aparelho de Electroforese capilar utilizado



O electrólito de separação utilizado foi preparado de forma a conter  $4.30 \times 10^{-2}$  M de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $2.70 \times 10^{-2}$  M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 8.5 % de acetonitrilo, originando um pH resultante de 9.15. O tempo de utilização do electrólito foi limitado a 2 dias, uma vez que após esse tempo as suas características eram alteradas, afectando o poder separativo da técnica.

O acondicionamento de um capilar novo foi feito da seguinte forma: lavagem com NaOH 1 M, durante 10 min, seguida de uma lavagem com NaOH 0.1 M, durante 30 min, lavagem com água ultra pura, durante 5 min e, por último, uma lavagem com electrólito, durante 10 min. No entanto, para além do acondicionamento do capilar novo, eram efectuadas lavagens quer no início e final do dia, quer entre análises. As lavagens diárias consistiam em lavagens com NaOH 1 M, NaOH 0.1 M, água e electrólito, durante 2 min cada, enquanto que entre análises apenas se lavava com NaOH 0.1 M, durante 5 min, água ultra pura, durante 2 min, e electrólito, durante 3 min. Todas as lavagens foram efectuadas à pressão de 20 psi e todas as soluções utilizadas foram filtradas, usando um filtro 0.22  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro.

A lavagem efectuada no final do dia consistia na passagem de NaOH 0.1 M, água e ar, com o objectivo de deixar o capilar em perfeitas condições para ser guardado.

O eluato de cada padrão obtido após o SPE foi sempre diluído a 20.00 ml com electrólito, de modo a que a percentagem de solvente orgânico presente na amostra não ultrapassasse os 25 %.

Os padrões utilizados para a determinação das taxas de recuperação foram injectados utilizando um sistema de pressão de 0.3 psi durante 10 segundos. A separação electroforética foi efectuada utilizando uma voltagem de 25 kv, durante 20 min, mantendo a temperatura do capilar a 25 °C, gerando uma corrente de cerca de 190  $\mu\text{A}$ . Os solutos foram detectados ao comprimento de onda de 214 nm, fazendo também a aquisição do seu espectro de absorção entre os 190 e 300 nm.

O electrólito de separação foi utilizado no máximo 3 vezes seguidas, sendo substituído por electrólito novo.

### 3.2. Determinação das taxas de recuperação com SPE

#### 3.2.1. Taxas de recuperação – estudo em padrões individuais com um eluente

A extracção em fase sólida foi inicialmente testada utilizando apenas o acetonitrilo como solvente. Para isso, prepararam-se soluções padrão de cada composto com concentração de  $2.50 \times 10^{-3}$  M. Efectuou-se a extracção de 40 ml de solução, utilizando-se um cartuxo de resina para cada composto, sendo cada análise por electroforese capilar efectuada 3 vezes.

Um dos factores que se torna relevante na capacidade de ligação do analito à fase estacionária é o pH a que se encontra a amostra. Por este motivo, foi testada a capacidade de ligação de um dos compostos, a vanilina, a dois valores de pH, 1 e 7.

Tabela 3 – Percentagem de recuperação para a vanilina e de composto não retido pelo cartuxo a pH 1 e 7

	Recuperação (%)	Não retido (%)
pH 1	88.6	0.5
pH 7	87.0	3.6

Analisando os resultados na Tabela 3, verificamos que se obtém uma recuperação similar, quer a pH 1, quer a pH 7. Outra observação que se pode fazer é que a retenção a pH 1 parece ser melhor, uma vez que a pH 7, 3.6 % do analito não é retido pela resina, saindo juntamente com a matriz. Após a degradação da amostra com CuO, esta é acidificada a pH inferior a 2 (ver ponto 4.1.2.), sendo esse o motivo da utilização de soluções padrão a pH 1 neste estudo.

Fez-se a extracção de 40 ml de cada solução padrão  $2.50 \times 10^{-3}$  M, preparada com água ultra pura acidificada a pH 1, usando como eluente 2.5 ml de acetonitrilo, que originou as percentagens de recuperação e percentagens de composto não retido apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Resumo das percentagens de recuperação dos compostos eluídos com acetonitrilo e dos compostos não retidos, em soluções individuais  $2.50 \times 10^{-3}$  M

Composto	Recuperação (%)	Não retido (%)
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	84.1	-----
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	n.d	n.d
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	<b>58.4</b>	0.6
Vanilina	88.6	-----
Acetovanilona	75.3	-----
Ácido vanílico	<b>64.5</b>	-----
Seringaldeído	72.9	-----
Ácido Serínico	70.4	0.21
Ácido Ferúlico	<b>44.0</b>	-----
Ácido <i>p</i> -cumárico	<b>58.0</b>	-----
Acetoseríngona	110.8	-----
Etilvanilina-p.interno	102.8	-----

n.d.: não determinado

Após a análise dos resultados apresentados na Tabela 4, decidimos que seria possível melhorar a recuperação de alguns compostos como, por exemplo, do ácido ferúlico, do ácido *p*-cumárico, do ácido *p*-hidroxibenzóico e do ácido vanílico, que apresentam valores inferiores a 65 %, utilizando, para isso, uma segunda eluição com um solvente menos polar que o acetonitrilo, com um índice de polaridade de 5.8 [29]. Como segundo eluente, poderíamos escolher o metanol, com índice de polaridade 5.1, o acetato de etilo, com 4.4, ou o etanol, com 4.3. Quanto à quantidade de composto não retido pela resina, é de salientar que, ou se tratam de quantidades muito baixas, ou impossíveis de detectar.

Na análise da *p*-hidroxiacetofenona, não foi possível obter a percentagem de recuperação devido a uma avaria do equipamento. No entanto, como para alguns compostos teríamos que testar a utilização de dois eluentes, nessa altura repetiríamos a análise da *p*-hidroxiacetofenona com o novo procedimento adoptado.

### 3.2.2. Taxas de recuperação – estudo em padrões individuais eluídos sequencialmente com dois solventes

Para escolher o segundo eluente, testamos em primeiro lugar o ácido ferúlico, uma vez que era o composto que apresentava a taxa de recuperação mais baixa.

Após a primeira eluição com acetonitrilo, efectuou-se uma segunda eluição com um dos seguintes solventes: metanol, acetato de etilo ou etanol.

Os resultados obtidos para a recuperação total do ácido ferúlico, após as duas eluições, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Percentagens de recuperação e de composto não retido para o ácido ferúlico utilizando uma eluição sequencial com dois eluentes

Eluição	Recuperação (%)	Não retido (%)
Acetonitrilo + metanol	91.5	1.2 %
Acetonitrilo + Acetato de etilo	88.9	0.6 %
Acetonitrilo + Etanol	60.1	0.2 %

Os resultados mostram que a percentagem de recuperação melhora largamente quando se utilizam sequencialmente dois solventes na eluição. Comparando os três tipos de eluição, é possível verificar que as eluições com acetonitrilo + metanol e acetonitrilo + acetato de etilo apresentam valores superiores de recuperação. No entanto, optando pelo uso do acetato de etilo, surgiriam dificuldades devidas à sua insolubilidade em água. O metanol, para além de ser solúvel em água, apresenta também a vantagem de ter um ponto de ebulição mais baixo, sendo, por isso, mais facilmente volatilizado, no caso de haver necessidade de uma reconcentração da amostra.

Após ter sido escolhido o método de eluição mais adequado para o ácido ferúlico, este foi aplicado a todos os compostos, tendo sido avaliadas as recuperações para cada composto em soluções individuais com concentração  $2.50 \times 10^{-3}$  M. Foram efectuadas três réplicas de extracção obtendo-se um valor médio e um desvio padrão relativo para a recuperação de cada fenol. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Percentagens de recuperação dos compostos eluídos sequencialmente com acetonitrilo e metanol e dos compostos não retidos (n=3), em soluções individuais  $2.50 \times 10^{-3}$  M

Composto	Recuperação		Não retido (%)
	Média (%)	RSD (%)	
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	89,4	5,4	2,2
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	91,6	2,7	0,7
Ac. <i>p</i> -hidroxibenzóico	108,6	12,3	0,6
Vanilina	102,6	2,0	0,0
Acetovanilona	106,1	8,3	0,9
Ac. Vanílico	109,4	8,3	1,1
Seringaldeído	113,2	2,1	3,5
Ac. Serínico	113,5	2,0	2,3
Ac. Ferúlico	89,2	6,5	0,3
Ac. <i>p</i> -cumárico	83,8	7,2	0,2
Acetoseringona	87,0	3,4	3,8
Etilvanilina - pinterno	106,8	2,5	0,3

Ao analisarmos os valores obtidos para cada composto individualmente, verificamos que a recuperação de todos os compostos apresentou valores superiores a 83.8 % e inferiores a 113.5 %, com um desvio padrão relativo inferior a 15 %.

No caso particular da *p*-hidroxiacetofenona, para a qual ainda não tínhamos qualquer valor de recuperação, verificamos que a utilização de uma eluição sequencial com os dois solventes origina uma recuperação bastante satisfatória de 91.6%, com um desvio padrão relativo de 2.7 % (n = 3).

### 3.2.3. Taxas de recuperação – estudo em soluções padrão mistura

Quando uma solução composta pelos 11 fenóis em estudo, com concentrações entre  $2.50 \times 10^{-4}$  e  $2.50 \times 10^{-3}$  M, e com padrão interno, etilvanilina,  $1.00 \times 10^{-3}$  M, são sujeitos ao procedimento de SPE proposto anteriormente, obtêm-se recuperações que diferem de composto para composto e de concentração para concentração. No gráfico seguinte (Figura 6), encontram-se representadas as recuperações obtidas para cada composto, quando presentes numa solução mistura e em concentrações crescentes.

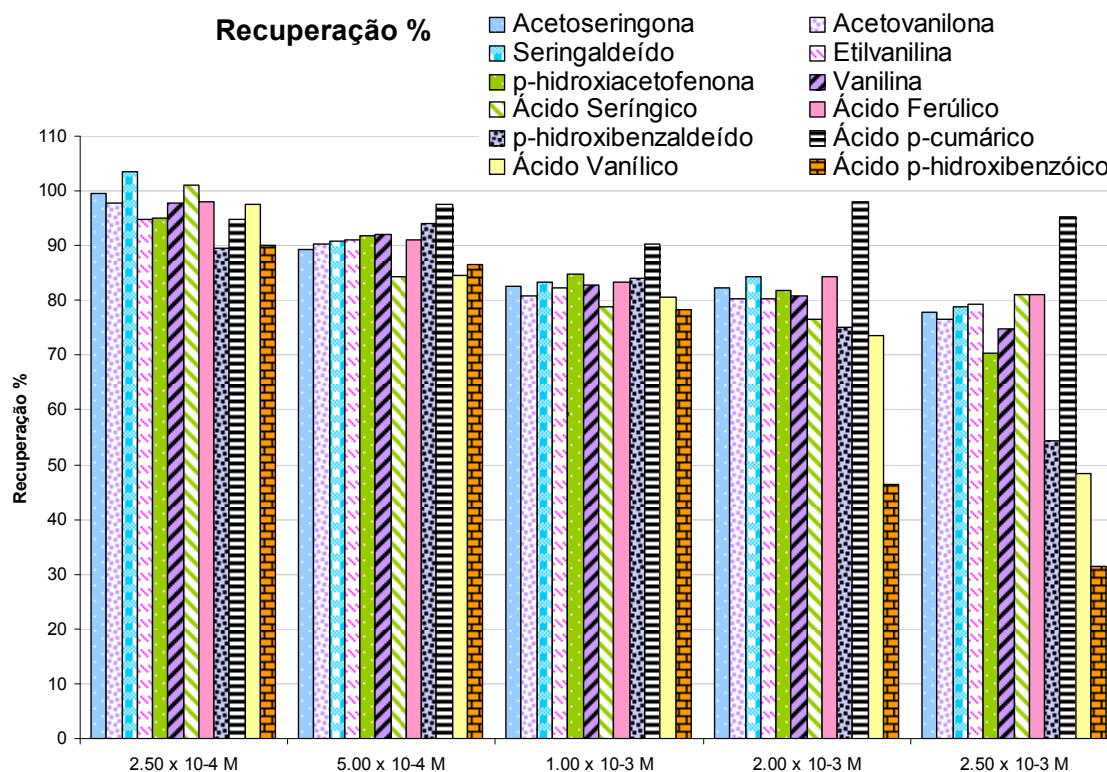


Figure 6 – Percentagens de recuperação obtidas para os diferentes fenóis presentes numa solução mista com concentrações entre  $2.50 \times 10^{-4}$  e  $2.50 \times 10^{-3}$  M com padrão interno  $1.00 \times 10^{-3}$  M

A observação do gráfico mostra-nos que os compostos apresentam ligeiras diferenças, no que respeita ao seu comportamento. Para concentrações baixas,  $2.50 \times 10^{-4}$  M, verificamos que as recuperações, para todos os compostos, se encontram perto dos 100 %, sendo o *p*-hidroxibenzaldeído e o ácido *p*-hidroxibenzóico os que apresentam valores mais baixos, perto dos 90 %. Para concentrações entre os  $5.00 \times 10^{-4}$  M e os  $1.00 \times 10^{-3}$  M, todos os compostos apresentam recuperações acima dos 75 %. No entanto, para concentrações mais elevadas constatamos a diminuição na recuperação de alguns compostos. Por exemplo, na mistura dos compostos que apresentam concentrações de  $2.00 \times 10^{-3}$  M, todos os compostos, excepto o ácido *p*-hidroxibenzóico, apresentam recuperações acima dos 70 %. O ácido *p*-hidroxibenzóico, neste caso, apresenta uma recuperação de 46.3 %. No caso da mistura testada com concentração mais elevada,  $2.50 \times 10^{-3}$  M, apenas o ácido *p*-cumárico apresenta recuperações acima dos 90 %, enquanto que compostos como o *p*-hidroxibenzaldeído, o ácido vanílico e o ácido *p*-hidroxibenzóico, apresentam valores de recuperação mais baixos (inferior a 60 %).

Pela análise dos resultados, é possível concluir que para o mesmo grupo de compostos, por exemplo, fenóis do grupo *p*-hidroxilo, a recuperação diminui com o aumento da

polaridade. O ácido *p*-hidroxibenzóico apresenta o valor mais baixo de recuperação (31.5 %), seguido do *p*-hidroxibenzaldeído (54.3 %) e da *p*-hidroxiacetofenona (70.3 %).

Para além da taxa de recuperação para cada composto em soluções mistura, foi também analisada a percentagem de composto que não ficou retido no cartucho de SPE. O gráfico com os resultados obtidos encontra-se apresentado na Figura 7. No que diz respeito à análise destes resultados, é fácil verificar que a capacidade de retenção dos cartuxos de SPE não é igual para todos os compostos. O único composto que apresenta uma retenção de 100 % em todas as misturas analisadas é o padrão interno, a etilvanilina, no entanto, não devemos esquecer que foi o único composto em que a concentração na solução mistura foi mantida constante, enquanto que para os outros compostos essa concentração foi crescente.

Para os 11 compostos fenólicos em questão, observam-se problemas de retenção devido à saturação do sorbente presente no cartucho. É fácil concluir a existência de competição entre os diversos compostos pelos locais de ligação à resina, tornando-se um facto muito importante quando a concentração atinge valores tão elevados como  $2.00 \times 10^{-3}$  M. Contudo, mesmo a estas concentrações tão elevadas, o problema não afecta todos os compostos da mesma forma.

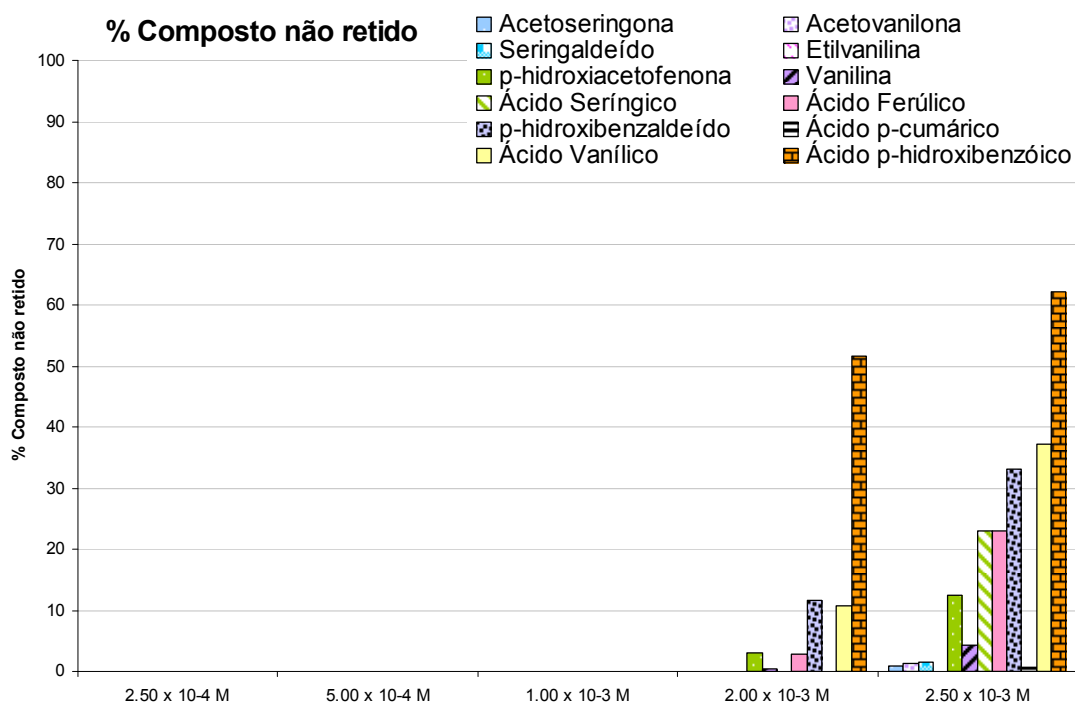


Figure 7 – Percentagens de composto não retido obtidas para os diferentes fenóis presentes numa solução mistura com concentrações entre  $2.50 \times 10^{-4}$  e  $2.50 \times 10^{-3}$  M com padrão interno  $1.00 \times 10^{-3}$  M

Os compostos com menor afinidade para os locais de ligação do sorbente são os que apresentam valores superiores de percentagem de composto não retido, tais como o ácido ferúlico, a *p*-hidroxiacetofenona, a vanilina, o *p*-hidroxibenzaldeído, o ácido vanílico e o ácido *p*-hidroxibenzóico, que chega a atingir os 60 %.

Para a mistura com  $2.50 \times 10^{-3}$  M é possível verificar que todos os compostos, excepto a etilvanilina, apresentam percentagens de composto não retido, sendo percentagens de valor baixo para compostos com elevada afinidade, tais como ácido *p*-cumárico (0.7 %), acetoseringona (0.9 %), acetovanilona (1.2 %) e seringaldeído (1.5 %), e de valores mais elevados, para compostos como o ácido *p*-hidroxibenzóico (62.2 %), ácido vanílico (37.3 %) e *p*-hidroxibenzaldeído (33.2 %), com menor afinidade.

### 3.3. Conclusão

A primeira etapa desta parte experimental, relacionada com o conteúdo fenólico existente nas amostras de solos, sujeitas a diferentes tipos de fertilização, consistiu na optimização da metodologia de extracção em fase sólida. Primeiro, usamos apenas um eluente para remover os analitos retidos nos cartuxos de SPE, no entanto, uma vez que os valores obtidos não foram os desejados, testamos uma sequência de eluição com dois eluentes. Após os testes efectuados, decidiu-se utilizar uma metodologia de eluição com acetonitrilo seguido de metanol. Escolhido o método de eluição efectuaram-se testes de recuperação com soluções mistura dos 12 fenóis em questão. Após a análise dos resultados de todas as recuperações, concluiu-se que a taxa de recuperação se podia relacionar com a polaridade dos compostos em questão, sendo o ácido *p*-hidroxibenzóico o que apresentava maiores problemas de retenção. No entanto, os problemas apresentados pelos compostos apenas se observam para concentrações superiores a  $2.00 \times 10^{-3}$  M. Uma vez que nas amostras de solos não se esperam concentrações tão elevadas, não serão necessários cuidados acrescidos devido à competição verificada entre os compostos.



## **4. AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRACÇÃO NUMA AMOSTRA REAL**

Após a realização de testes de recuperação utilizando padrões individuais e misturas com diversas concentrações, efectuaram-se testes de reprodutibilidade utilizando uma amostra de solo. Inicialmente, testamos apenas a parte da extracção em fase sólida numa amostra real, seguida da reprodutibilidade do processo completo, incluindo a parte da degradação com óxido de cobre.

### **4.1. Metodologia experimental**

#### **4.1.1. Preparação de soluções e condições experimentais de análise**

Para a obtenção das rectas de calibração, prepararam-se 6 padrões mistura com concentrações entre  $2.50 \times 10^{-6}$  e  $2.00 \times 10^{-4}$  M. Estes padrões foram preparados por diluição das soluções-mãe ( $1.00 \times 10^{-2}$  M) com água ultra-pura.

O capilar utilizado na análise, o electrólito e os métodos de lavagem efectuadas foram os mesmos utilizados anteriormente, durante os testes de recuperação com padrões (ponto 3.1.4).

A injeção dos padrões foi efectuada tendo em conta as concentrações dos mesmos. Para padrões de menor concentração  $2.50 \times 10^{-6}$  M e  $5.00 \times 10^{-6}$  M efectuaram-se injeções de 0.3 psi durante 10 segundos; no caso de padrões intermédios,  $2.50 \times 10^{-5}$  M e  $5.00 \times 10^{-5}$  M as injeções foram de 8 segundos a 0.3 psi; no caso dos 2 padrões mais elevados,  $1.00 \times 10^{-4}$  M e  $2.00 \times 10^{-4}$  M, as injeções foram de 0.3 psi, durante 7 segundos. No que diz respeito às injeções das amostras, estas foram injectadas com uma pressão de 0.3 psi durante 10 segundos.

Para a separação, utilizou-se uma voltagem de 25 kV, durante 25 min, e manteve-se a temperatura do capilar a 25 °C, originando uma corrente de cerca de 200  $\mu$ A. Os solutos foram monitorizados efectuando a detecção a 214 nm.

Todas as soluções utilizadas foram filtradas por um filtro de 0.22  $\mu$ m (Millex-GV da Millipore) antes da sua análise.

#### 4.1.2. Degradação das amostras

Os fenóis derivados da degradação da matéria orgânica foram obtidos com base no método descrito por Hedges and Ertel (1982), que envolve a oxidação de 5 g de amostra de solo com óxido de cobre (CuO). As amostras foram colocadas em recipientes de Teflon, fechadas dentro de mini bombas de aço, juntamente com 200 mg de  $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ , 2 g de Óxido de cobre e 7 ml de NaOH 2 M, previamente purgado com azoto. As bombas e os reagentes foram deixados, durante uma noite, dentro de uma câmara de azoto.

As oxidações foram realizadas mantendo as bombas fechadas a 170 °C, durante 3 horas, numa estufa (Figura 8).



Figura 8 – Mini-bombas de aço na estufa

Após as 3 horas, as bombas foram arrefecidas, colocando-as fechadas debaixo de água fria, e foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno  $1.00 \times 10^{-2}$  M a cada bomba. O sobrenadante do recipiente foi guardado e o sedimento foi lavado com 4 porções de 5 ml de NaOH 1 M, previamente purgado com azoto. Os sobrenadantes e as porções de NaOH usados na lavagem do sedimento foram misturados, acidificados com HCl 6 M até pH 1 e sujeitos à centrifugação a 4000 rpm, durante 10 min. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado lavado, com água acidificada a pH 1, e sujeito a uma nova centrifugação.

De modo a ser possível efectuar a avaliação apenas do processo de extracção em fase sólida a que a amostra é sujeita, fez-se a sua degradação em 3 bombas separadas (3

réplicas) e juntaram-se e homogeneizaram-se os sobrenadantes resultantes. Depois, essa mistura foi dividida em 3 partes iguais, sendo cada uma sujeita ao procedimento de extracção em fase sólida. Com este método de preparação da amostra, conseguimos avaliar apenas a etapa de extracção em fase sólida, não podendo qualquer diferença no resultado ser atribuída à degradação com CuO.

De modo a ser avaliado todo o procedimento, desde a degradação até à extracção em fase sólida, fez-se a análise dos fenóis em três réplicas de uma amostra de solo.

### **4.1.3. Metodologia da extracção em fase sólida**

A metodologia adoptada para o procedimento de extracção em fase sólida foi a utilizada anteriormente (ponto 3.1.3), sendo efectuados alguns ajustes.

A etapa do acondicionamento, com 2 ml de acetonitrilo, 2 ml de metanol e 2 ml de água, seguida de uma breve secagem da resina e da passagem da amostra, foi realizada da mesma forma. No que diz respeito à eluição, esta sofreu uma ligeira modificação, de modo a diminuir-se o volume final e a conseguir-se uma pré-concentração da amostra. Assim, fez-se a eluição com 2.5 ml de acetonitrilo seguidos de 5 ml de metanol. Esta última fracção foi recolhida em separado e o metanol evaporado. O resíduo obtido foi recuperado com a fracção de acetonitrilo eluída. Assim, quando diluímos a fracção orgânica eluída com electrólito, e de modo a que a parte orgânica esteja presente numa percentagem de 25 %, apenas obtemos um volume final de 10 ml (7.5 ml de electrólito e 2.5 ml de solvente orgânico).

## **4.2. Análise de resultados**

### **4.2.1. Eficiência do método**

A separação dos 12 fenóis foi conseguida utilizando as condições optimizadas (ponto 4.1.1) e os tempos de migração característicos para cada composto encontram-se apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Tempos de migração e intervalo de confiança a 95 % (n=21)

Composto	Tempo de Migração (min)
Acetoseringona	8,86 ± 0,03
Acetovanilona	9,78 ± 0,04
Seringaldeído	10,26 ± 0,04
Etilvanilina (PI)	10,48 ± 0,04
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	10,79 ± 0,06
Vanilina	11,79 ± 0,05
Ácido Serínico	12,64 ± 0,08
Ácido Ferúlico	13,1 ± 0,1
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	14,19 ± 0,09
Ácido <i>p</i> -cumárico	15,3 ± 0,1
Ácido Vanílico	15,7 ± 0,2
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	19,7 ± 0,3

Um electroferograma típico de uma mistura padrão encontra-se apresentado na Figura 9.

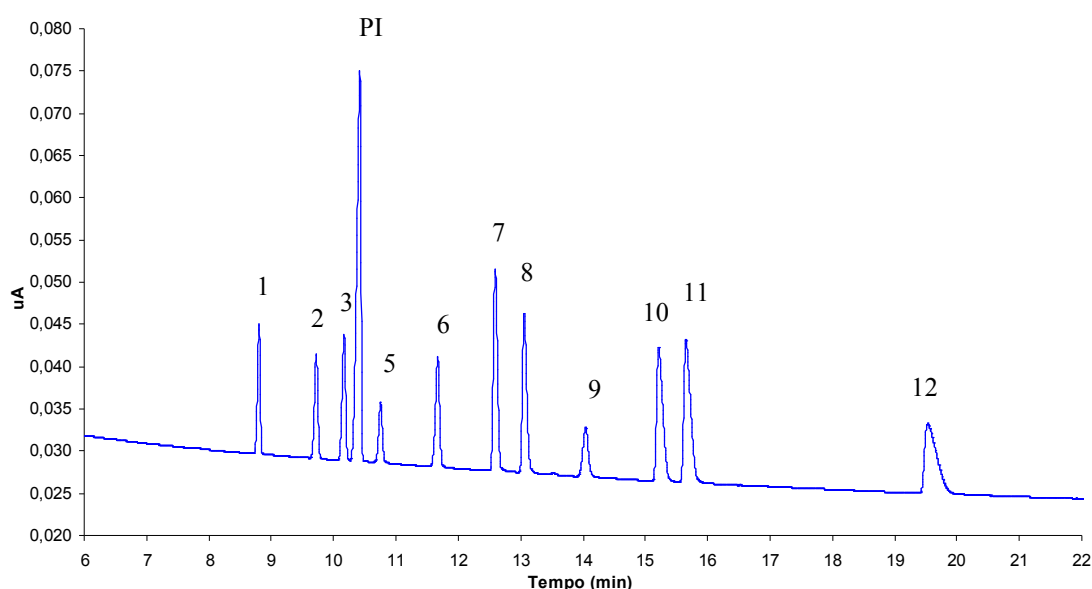


Figura 9 – Electroferograma de uma mistura padrão com concentração  $1.00 \times 10^{-4}$  M para o padrão interno e com  $2.50 \times 10^{-4}$  M para os outros analitos. Identificação dos picos: (1) Acetoseringona, (2) Acetovanilona, (3) Seringaldeído, (PI) Etilvanilina, (5) *p*-hidroxiacetofenona, (6) Vanilina, (7) Ácido Serínico, (8) Ácido Ferúlico, (9) *p*-hidroxibenzaldeído, (10) Ácido *p*-cumárico, (11) Ácido Vanílico e (12) Ácido *p*-hidroxibenzóico.

Para a determinação quantitativa de cada composto foi efectuada uma curva de calibração, com concentrações entre  $2.50 \times 10^{-6}$  e  $2.00 \times 10^{-4}$  M, e padrão interno com concentração de  $1.00 \times 10^{-4}$  M. As razões das áreas entre os analitos e o padrão interno foram representadas em função das respectivas razões de concentração. Cada ponto das curvas de calibração corresponde à média de 3 medições independentes.

A título de exemplo, na Figura 10 encontra-se a recta de calibração obtida para a acetoseringona, composto que apresenta o menor tempo de migração.

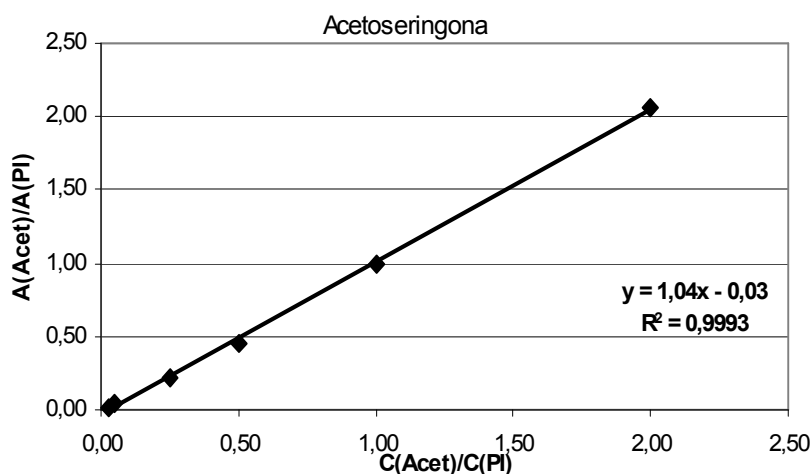


Figura 10 – Recta de calibração obtida para a acetoseringona

A Tabela 8 apresenta os valores obtidos para o declive, ordenada de origem e coeficiente de correlação ( $r^2$ ), para as rectas de calibração de cada composto.

Tabela 8 – Resumo dos parâmetros obtidos para cada recta de calibração

Pico	Composto	Declive	Ordenada na origem	$r^2$
1	Acetoseringona	1,04	-0,028	0,9993
2	Acetovanilona	0,95	-0,008	0,9999
3	Seringaldeído	1,19	-0,031	0,9995
5	<i>p</i> -hidroxiacetofenona	0,61	0,013	0,9996
6	Vanilina	1,19	-0,023	0,9996
7	Ácido Serínico	1,89	-0,072	0,9920
8	Ácido Ferúlico	1,82	-0,006	0,9988
9	<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	0,83	0,026	0,9997
10	Ácido <i>p</i> -cumárico	2,30	-0,038	0,9967
11	Ácido Vanílico	2,50	-0,051	0,9968
12	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	2,21	0,016	0,9996

Os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) variam desde 0.9920 para o ácido serínico e 0.9999 para a acetovanilona. No entanto, a eficiência do método pode ser avaliada por outros parâmetros para além do coeficiente de correlação, através da linearidade ( $\text{Lin} (\%) = 100 - \text{RSD}_b$ , onde o  $\text{RSD}_b$  se refere ao desvio padrão do declive), a sensibilidade analítica (AS, desvio padrão residual dividido pelo declive [15]. Na Tabela 9, para além destes parâmetros, apresenta-se também o limite de detecção (LOD).

Tabela 9 – Resumo dos dados de precisão obtidos para cada recta de calibração

Pico	Composto	LOD (mol/dm <sup>3</sup> )	Lin(%)	AS
1	Acetoseringona	6,74E-06	99,986	0,022
2	Acetovanilona	2,94E-06	99,994	0,010
3	Seringaldeído	6,50E-06	99,985	0,022
5	<i>p</i> -hidroxiacetofenona	2,64E-06	99,993	0,009
6	Vanilina	5,29E-06	99,988	0,018
7	Ácido Serínico	1,25E-05	99,902	0,042
8	Ácido Ferúlico	4,81E-06	99,964	0,016
9	<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	7,28E-06	99,988	0,024
10	Ácido <i>p</i> -cumárico	8,02E-06	99,924	0,027
11	Ácido Vanílico	7,92E-06	99,918	0,026
12	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	4,91E-06	99,979	0,016

Como se pode ver na Tabela 9, todos os compostos fenólicos apresentam bons resultados relativos aos parâmetros de precisão estudados. O LOD obtido varia entre  $2.64 \times 10^{-6}$  M para a *p*-hidroxiacetofenona e  $1.25 \times 10^{-5}$  M para o ácido serínico.

#### 4.2.2. Avaliação da extracção em fase sólida

De modo a ser possível avaliar o processo de extracção em fase sólida numa amostra, sujeitamos 3 sub-amostras, degradadas com óxido de cobre, ao mesmo procedimento de extracção. A análise electroforética das amostras e resultados obtidos foram muito semelhantes. A título de exemplo, na Figura 11, encontra-se um electroferograma de uma das sub-amostras analisadas. No entanto, todos os outros electroferogramas obtidos apresentam os mesmos picos e com intensidade semelhante.

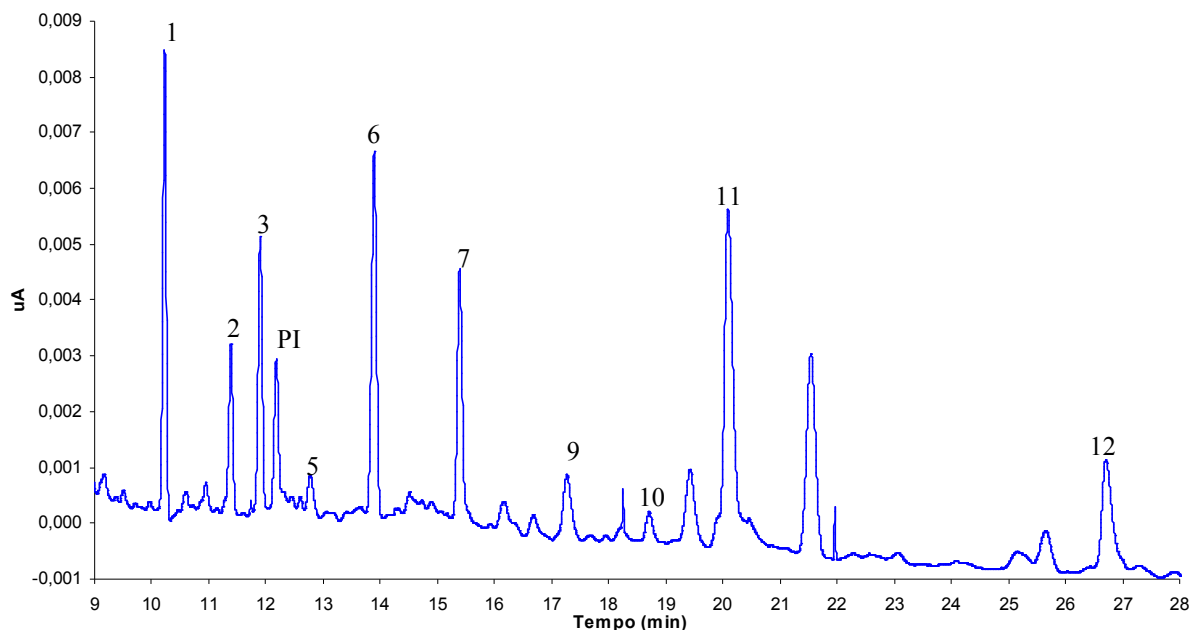


Figura 11 – Electroferograma de uma amostra de solo, após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno  $5.00 \times 10^{-5}$  M. Identificação dos picos: (1) Acetoseríngona, (2) Acetovanilona, (3) Seringaldeído, (PI) Etilvanilina, (5) *p*-hidroxiacetofenona, (6) Vanilina, (7) Ácido Seríngico, (9) *p*-hidroxibenzaldeído, (10) Ácido *p*-cumárico, (11) Ácido Vanílico e (12) Ácido *p*-hidroxibenzóico.

A identificação de cada um dos picos da amostra foi efectuada através da adição de um dado volume de uma mistura dos padrões e verificação do crescimento dos picos correspondentes aos compostos em estudo.

A determinação do conteúdo de fenóis na amostra de solo foi feita utilizando as rectas de calibração apresentadas na Tabela 7. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos, bem como o respectivo desvio padrão relativo, para cada um dos fenóis.

Tabela 10 – Concentrações dos fenóis numa amostra de solo e respectivo RSD (n=3). As diferenças entre réplicas apenas têm em conta o processo de SPE e o método analítico.

<b>Fenóis Vanililo</b>	<b>µg/g de solo</b>	<b>RSD (%)</b>
Vanilina	29	2.3
Acetovanilona	17	4.9
Ácido Vanílico	24	9.2
<b>Fenóis Seringilo</b>	<b>µg/g de solo</b>	<b>RSD (%)</b>
Seringaldeído	19	0.4
Acetoseringona	49	2.1
Ácido Serínico	22	17.2
<b>Fenóis <i>p</i>-hidroxilo</b>	<b>µg/g de solo</b>	<b>RSD (%)</b>
<i>p</i> -Hidroxibenzaldeído	8	28.3
<i>p</i> -Hidroxiacetofenona	2	4.9
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	8	26.1
<b>Fenóis Cinamilo</b>	<b>µg/g de solo</b>	<b>RSD (%)</b>
Ácido Ferúlico	n.d	n.d
Ácido <i>p</i> -Cumárico	5	5

n.d.: não detectado

Analisando os resultados apresentados na Tabela 10, verificamos que os valores dos desvios padrões relativos se encontram entre 0.4 %, para o caso do seringaldeído, e 28.3 %, para o *p*-hidroxibenzaldeído. Estes valores de RSD indicam que o método de extracção adoptado poderá ser aplicado na extracção deste fenóis em amostras de solos.

Uma vez que os resultados obtidos para as diferentes réplicas de extracção não apresentam valores de RSD excessivamente elevados, resta-nos agora testar todo o processo de preparação da amostra.

#### 4.2.3. Avaliação de todo o método de preparação da amostra

Após o processo de extracção ter sido testado e de termos verificado que este contribui com uma variabilidade aceitável no resultado final de cada fenol, resta-nos verificar a variabilidade causada por todo o processo de preparação da amostra. Para avaliar esse processo, efectuou-se a degradação de 3 sub-amostras, retiradas de uma mesma amostra de solo, em separado e obtiveram-se os resultados para cada família, apresentados na Tabela 11, bem como o respectivo RSD.



Tabela 11 – Concentrações dos fenóis numa amostra de solo e respectivo RSD (n=3). As diferenças entre réplicas, para além do processo de SPE e do método analítico, têm em conta a variabilidade causada pelo processo de degradação com CuO

<b>Fenóis Vanililo</b>	<b>µg/g de solo</b>	<b>RSD (%)</b>
Vanilina	31	24.3
Acetovanilona	19	17.2
Ácido Vanílico	29	15.4
<b>Fenóis Seringilo</b>	<b>µg/g de solo</b>	<b>RSD (%)</b>
Seringaldeído	26	25.7
Acetosingona	54	20.1
Ácido Séríngico	21	25.9
<b>Fenóis <i>p</i>-hidroxilo</b>	<b>µg/g de solo</b>	<b>RSD (%)</b>
<i>p</i> -Hidroxibenzaldeído	11	63.1
<i>p</i> -Hidroxiacetofenona	5	20.3
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	11	8.4
<b>Fenóis Cinamilo</b>	<b>µg/g de solo</b>	<b>RSD (%)</b>
Ácido Ferúlico	n.d	n.d
Ácido <i>p</i> -Cumárico	3	22.2

n.d.: não detectado

Analisando os resultados apresentados na Tabela 11, verifica-se que as diferenças entre réplicas são superiores às obtidas no caso anterior, em que apenas se testava o processo de extracção. Se compararmos os resultados relativos ao RSD, verificamos que quando se trata de réplicas de todo o processo de preparação da amostra, o desvio padrão relativo apresenta valores elevados, tendo-se obtido um valor mínimo de 8.4 % para o caso do ácido *p*-hidroxibenzóico. No entanto, os resultados obtidos para os outros fenóis apresentam valores superiores, atingindo um máximo para o *p*-hidroxibenzaldeído, com RSD a atingir o valor de 63.1%. Estes valores divergentes devem-se, provavelmente, ao facto da degradação não ocorrer na mesma intensidade para as diversas amostras. No entanto, é de esperar que todos os compostos em estudo sejam afectados de forma semelhante na mesma réplica. Assim, ao calcularmos as razões, correspondentes aos parâmetros da lenhina, utilizadas para caracterizar as amostras, é de esperar que estas apresentem valores inferiores de RSD.

Na Tabela 12, encontram-se as médias e respectivos RSD para cada um dos parâmetros da lenhina.

Tabela 12 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis da Tabela 11 e respectivo RSD (n=3)

Parâmetros da Lenhina	Média	RSD (%)
PON/P	0.19	3.1
P/(V+S)	0.18	3.0
S/V	1.1	9.9
C/V	0.04	11.9
(Ad/Al) <sub>p</sub>	1.2	26.0
(Ad/Al) <sub>v</sub>	0.85	14.3
(Ad/Al) <sub>s</sub>	0.73	19.9

Se analisarmos os resultados obtidos para as razões calculadas, verificamos que os resultados são semelhantes entre réplicas, apresentando desvios padrões relativos baixos. Como se pode observar, a influência causada pela existência de extensões diferentes de degradação entre réplicas, pode ser reduzida utilizando estes parâmetros, uma vez que se tratam de razões entre valores de fenóis obtidos na mesma degradação.

Como podemos ver, os valores de RSD variam entre 3.0 %, para o P/(V+S), e 26.0 %, para o caso da razão (Ad/Al)<sub>p</sub>. No entanto, são valores perfeitamente aceitáveis e bastante melhores do que os obtidos para os compostos individuais.

#### 4.3. Conclusões

Este capítulo do trabalho tinha como objectivo analisar a variabilidade causada pelo método de preparação da amostra. Para isso foi necessário optimizar as condições de análise em padrões dos fenóis, de modo a poderem-se obter as diversas rectas de calibração. Em seguida, testamos a parte da extracção em fase sólida numa amostra real, bem como todo o processo de preparação da amostra, desde a degradação com óxido de cobre até à extracção. No que diz respeito às rectas de calibração, obtivemos valores de precisão muito satisfatórios, tendo sido conseguida a análise dos 12 compostos fenólicos em menos de 20 minutos.

Em relação aos resultados obtidos nas amostras de solo, foi possível verificar que a variabilidade causada pelo processo de extração em fase sólida é bastante inferior à variabilidade causada pela degradação com óxido de cobre, realizada numa estufa a 170 °C. Por este motivo, considerou-se que o novo processo de extração otimizado se encontrava perfeitamente adequado a este método de preparação da amostra.

Após todos estes testes e optimizações, adoptou-se este procedimento para caracterizar as várias amostras de solos, sujeitos a diferentes tipos de fertilizações. O intuito deste trabalho será obter os diferentes valores para os parâmetros da lenhina, bem como a existência ou ausência de alguns fenóis em solos fertilizados de diferentes formas, que os possam de alguma forma diferenciar.

## **5. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO EM AMOSTRAS DE SOLO SUJEITOS A DIFERENTES FERTILIZAÇÕES**

Após terem sido efectuados todos os testes necessários à optimização e avaliação da variabilidade e eficiência do método experimental, aplicou-se esse mesmo método a todas as amostras.

A determinação do conteúdo fenólico existente em cada amostra foi determinada em função do conteúdo de matéria orgânica existente em cada solo. O conteúdo de matéria orgânica é utilizado para estimar, de modo grosseiro, o conteúdo de carbono orgânico total. A determinação da matéria orgânica, por perda de massa, envolve a destruição de toda a matéria orgânica, no solo ou sedimento, por combustão. Uma massa conhecida de amostra é colocada num cadinho de cerâmica e levada à mufla, durante umas horas. A amostra no final do tratamento é arrefecida num excicador e pesada. O conteúdo de matéria orgânica é calculado por diferença entre a massa inicial e final da amostra, dividida pela massa inicial. Um problema que advém desta determinação, quando as temperaturas são superiores a 440 °C, deve-se à destruição dos carbonatos inorgânicos que poderão existir na amostra. Uma forma de eliminar este problema, é através do pré-tratamento da amostra com HCl ou HF, com o intuito de remover essa matéria mineral [31].

### **5.1. Metodologia experimental**

A metodologia aplicada à degradação das amostras de solo está de acordo com o procedimento descrito no ponto 4.1.2 deste capítulo. Após a degradação, efectuou-se a extracção em fase sólida de acordo com o procedimento descrito no ponto 4.1.3. A análise por electroforese capilar foi efectuada usando uma pressão de injeção de 0.3 psi, durante 10 segundos. A separação foi efectuada utilizando uma voltagem de 25 kV, durante 25 min, mantendo a temperatura do capilar a uma temperatura constante de 25 °C, originando uma corrente de cerca de 200 µA. Os solutos foram monitorizados efectuando a detecção a 214 nm.

De modo a comparar o conteúdo de fenóis entre amostras, relacionou-se esse conteúdo com a percentagem de matéria orgânica existente em cada solo. Para isso, determinou-se o

conteúdo de matéria orgânica em 10 g de solo, colocados num cadinho, por combustão a 550 °C, durante 6 horas. Previamente, o solo foi tratado com HCl, adicionando-se 1 ml de HCl 1 M, por cada grama de solo, e deixando-se em repouso durante 1 hora. Após esse tempo, secou-se o solo num banho-maria a 40 °C, com uma corrente de ar, durante algumas horas, seguido de uma noite na estufa a 105 °C. Pela perda de massa determinou-se o conteúdo de matéria orgânica em cada amostra de solo, sendo, desta forma possível calcular o conteúdo de cada fenol por grama de matéria orgânica.

## 5.2. Análise de resultados

### 5.2.1. Percentagem de matéria orgânica

Na Tabela 13, encontram-se os valores de matéria orgânica existente em cada solo em estudo, em cada uma das 3 réplicas efectuadas, bem como a média de valores e respectivo limite de confiança. É também apresentada a média obtida por fertilização, bem como o seu desvio padrão relativo.

Tabela 13 – Percentagem de matéria orgânica em cada solo analisado e respectivo limite confiança 95 % (n=3), bem como a média e RSD (%) para cada tipo de fertilização

Fertilização	Solo	% matéria orgânica	% Média Mat. Org.	RSD (%)
MIN	2	5.0 ± 0.1	5.3	6.3
	37	5.34 ± 0.01		
	29	5.67 ± 0.01		
FYM	16	5.7 ± 0.3	5.5	9.3
	27	5.9 ± 0.4		
	39	4.92 ± 0.07		
COM	7	10.4 ± 0.2	9.4	11.2
	19	9.4 ± 0.4		
	24	8.3 ± 0.9		
SLU	6	6.1 ± 0.1	6.2	5.2
	23	6.6 ± 0.1		
	33	5.9 ± 0.4		

Analisando os resultados obtidos, é possível verificar, como seria de esperar, que os solos sujeitos a fertilizações mineral e com estrumes animais são os que apresentam uma menor percentagem de matéria orgânica, com um valor médio de 5.3 e 5.5 % e RSD de 6.3 e 9.3 %, respectivamente. No extremo oposto situa-se o solo fertilizado com composto, que

chega a apresentar valores de 10 % em matéria orgânica para o solo 7, com um valor médio de 9.4 % e RSD de 11.2 %.

### 5.2.2. Solos com fertilização mineral

O conteúdo fenólico dos solos 2, 29 e 37, sujeitos a uma fertilização mineral, foi analisado e os electroferogramas, de uma das réplicas de cada uma das amostras, estão representados na Figura 12.

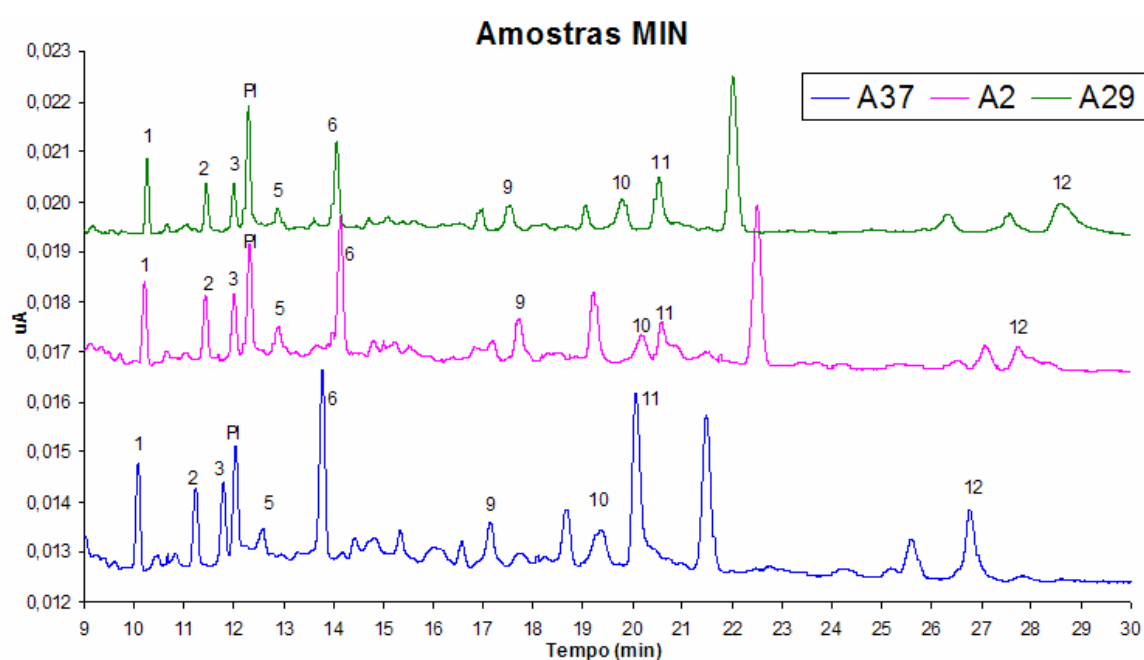


Figura 12 – Electroferograma de três amostras de solo com fertilização mineral após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno  $5.00 \times 10^{-5}$  M. Identificação dos picos: (1) Acetoseríngona, (2) Acetovanilona, (3) Seringaldeído, (PI) Etilvanilina, (5) *p*-hidroxiacetofenona, (6) Vanilina, (9) *p*-hidroxibenzaldeído, (10) Ácido *p*-cumárico, (11) Ácido Vanílico e (12) Ácido *p*-hidroxibenzóico

Pela análise da figura, verificamos que os electroferogramas obtidos, para cada um dos solos sujeitos à mesma fertilização mineral, são muito semelhantes. É possível em cada um dos electroferogramas encontrar 10 dos 11 compostos em estudo. Verificamos que compostos, como ácido ferúlico e o ácido séríngico não se encontram presentes em nenhum dos solos sujeitos a uma fertilização mineral.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos nos três solos com fertilização mineral.

Tabela 14 – Resultados para cada fenol obtido nos solos sujeitos a uma fertilização mineral e limite de confiança a 95 % (n=6)

Composto	Solo 2 µg/g mat. org.	Solo 29 µg/g mat. org.	Solo 37 µg/g mat. org.
Acetoseringona	279 ± 8	192 ± 7	388 ± 7
Acetovanilona	216 ± 2	111 ± 2	284 ± 2
Seringaldeído	183 ± 6	101 ± 6	214 ± 6
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	112 ± 2	53 ± 2	114 ± 2
Vanilina	368 ± 4	184 ± 4	522 ± 5
Ác. Serínico	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. Ferúlico	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	124 ± 4	79 ± 4	171 ± 4
Ac. <i>p</i> -cumárico	77 ± 8	62 ± 7	152 ± 7
Ac. Vanílico	70 ± 7	73 ± 7	344 ± 11
Ac. <i>p</i> -hidroxibenzóico	49 ± 4	31 ± 3	134 ± 3
Total	1478 ± 16	887 ± 15	2323 ± 18

n.d.: não detectado

Genericamente, os resultados são ligeiramente diferentes quando se comparam os três solos. A explicação poderá relacionar-se quer com a variabilidade inerente aos próprios solos, quer com o processo de degradação da amostra. No entanto, em todos os solos, é notória a existência da vanilina e da acetoseringona em maior quantidade, em relação aos outros compostos, indicando elevada contribuição de plantas lenhosas [8]. Outro facto é a ausência de dois compostos, o ácido serínico e o ácido ferúlico, nestes solos sujeitos a uma fertilização mineral.

Para além do conteúdo fenólico, foram também determinados os parâmetros da lenhina, que se encontram apresentados na Tabela 15. Uma vez que, anteriormente, foi verificado falta de reprodutibilidade relacionada com a degradação alcalina com óxido de cobre, o cálculo dos parâmetros da lenhina torna-se importante para se poderem comparar amostras.

Tabela 15 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis em cada solo mineral e limite de confiança a 95 % (n=6)

Parâmetros da Lenhina	Solo 2	Solo 29	Solo 37
PON/P	0.38 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.262 ± 0.006
P/(V+S)	0.334 ± 0.009	0.33 ± 0.01	0.310 ± 0.005
S/V	0.59 ± 0.01	0.66 ± 0.02	0.438 ± 0.008
C/V	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.129 ± 0.006
(Ad/Al) <sub>p</sub>	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.70 ± 0.03
(Ad/Al) <sub>v</sub>	0.17 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.60 ± 0.02
(Ad/Al) <sub>s</sub>	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: não determinado

Ao analisarmos os resultados verificamos que, apesar da diferença entre os parâmetros obtidos para os diferentes solos, é possível retirar conclusões sobre os solos sujeitos a fertilizações minerais. Hedges et al. (1988) verificaram que a *p*-hidroxiacetofenona deriva predominantemente da lenhina, enquanto tecidos não lenhosos libertam prioritariamente *p*-hidroxibenzaldeído e ácido *p*-hidroxibenzóico. Assim, as razões baixas de PON/P, inferior a 1, observadas indicam a existência de uma fonte adicional de fenóis do grupo *p*-hidroxilo, para além da lenhina, ou seja, uma contribuição de plantas herbáceas. No entanto, a razão C/V também pode ser utilizada para confirmar a contribuição de tecidos não lenhosos para a matéria orgânica [15]. Valores baixos de C/V indicam uma baixa contribuição de tecidos não lenhosos, uma vez que os compostos do grupo cinamilo (ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico) derivam da contribuição de tecidos não lenhosos [13]. O parâmetro S/V dá indicações sobre a origem da matéria orgânica em estudo, ou seja, se a matéria orgânica deriva principalmente de plantas angiospérmicas ou gimnospérmicas [8]. Assim, os valores baixos observados indicam-nos a existência de uma maior contribuição de plantas gimnospérmicas.

No que diz respeito às razões ácido/aldeído, sabe-se que indicam o estado de degradação da lenhina. Razões ácido/aldeído baixas, como é o caso, sugerem a existência de uma lenhina pouco degradada [10]. A razão P/(V+S) também indica a existência de uma maior ou menor degradação, uma vez que a existência de desmetilação origina perda selectiva de grupos metoxi dos fenóis (fenóis vanílicos e seringílicos), enquanto que os grupos não metilados não sofrem qualquer alteração [11]. Assim, os valores baixos observados para esta razão indicam um baixo grau de degradação da matéria orgânica. Em conclusão, podemos dizer que a matéria orgânica presente nestes solos é originada, principalmente, pelas plantas neles cultivadas, já que o grau de degradação da matéria orgânica não parece ser muito extenso.

### 5.2.3. Solos fertilizados com lamas de ETAR

O conteúdo fenólico dos solos 6, 23 e 33, sujeitos a uma fertilização com lamas (SLU) provenientes de estações de tratamento de esgotos, foi analisado e os electroferogramas, de uma das réplicas de cada uma das amostras, apresentam-se na Figura 13.



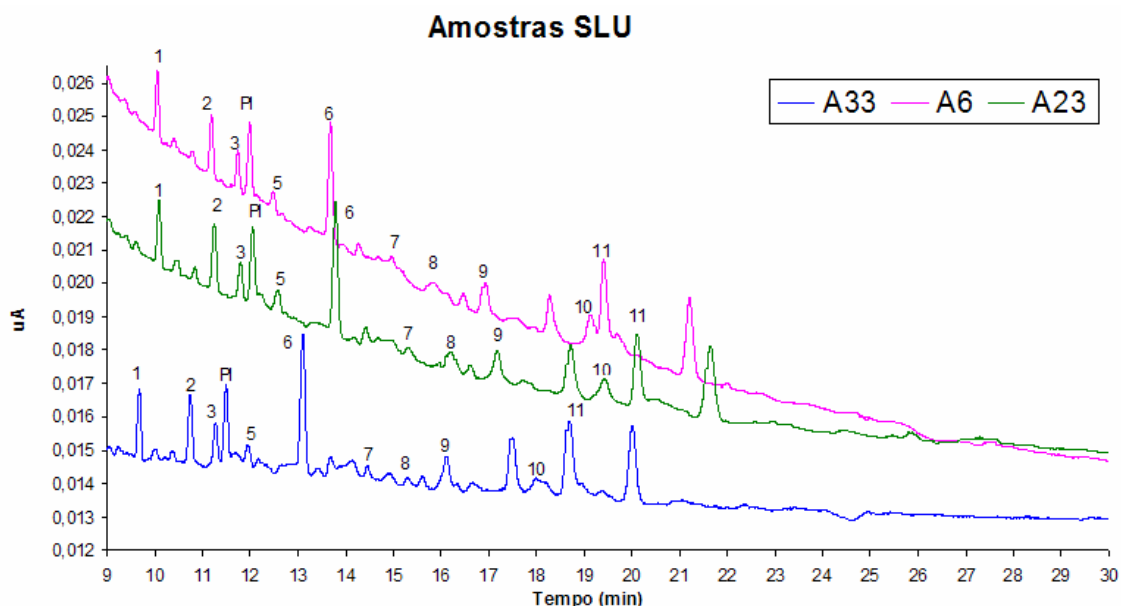


Figura 13 – Electroferograma de três amostras de solo fertilizado com lamaz de ETAR após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno  $5.00 \times 10^{-5}$  M. Identificação dos picos: (1) Acetoseringona, (2) Acetovanilona, (3) Seringaldeído, (PI) Etilvanilina, (5) *p*-hidroxiacetofenona, (6) Vanilina, (7) Ácido Serínico, (8) Ácido Ferúlico, (9) *p*-hidroxibenzaldeído, (10) Ácido *p*-cumárico e (11) Ácido Vanílico

A partir dos electroferogramas, foram determinadas as áreas dos picos e obtidas as concentrações de cada composto presente na amostra. Os resultados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Resumo dos resultados para cada fenol obtido nos solos sujeitos a uma fertilização com lamaz e limite de confiança a 95 % (n=6)

Composto	Solo 6 µg/g mat. org.	Solo 23 µg/g mat. org.	Solo 33 µg/g mat. org.
Acetoseringona	268 ± 6	244 ± 6	307 ± 7
Acetovanilona	251 ± 2	257 ± 2	292 ± 2
Seringaldeído	153 ± 5	120 ± 5	138 ± 5
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	74 ± 1	83 ± 2	89 ± 2
Vanilina	413 ± 5	405 ± 5	474 ± 5
Ác. Serínico	48 ± 11	32 ± 11	52 ± 12
Ac. Ferúlico	46 ± 5	31 ± 5	30 ± 5
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	145 ± 3	138 ± 3	185 ± 3
Ac. <i>p</i> -cumárico	74 ± 7	69 ± 6	31 ± 7
Ac. Vanílico	214 ± 7	158 ± 7	133 ± 7
Ac. <i>p</i> -hidroxibenzóico	n.d.	n.d.	n.d.
Total	1686 ± 19	1536 ± 18	1730 ± 20

n.d.: não detectado

A grande diferença observada, na análise destes solos sujeitos a fertilização com lamas de estações de tratamento, é a existência de ácido séríngico e ácido ferúlico, mesmo que em pequenas quantidades, coisa que não acontecia nos solos sujeitos a uma fertilização mineral. Por outro lado, verificamos a ausência de um composto, ácido *p*-hidroxibenzóico, que mesmo em pequenas quantidades, se encontrava presente nos solos minerais.

Nestes três solos fertilizados com lamas, verificamos que os resultados obtidos são da mesma ordem de grandeza, sendo a vanilina o composto que se encontra presente em maior quantidade. No entanto, compostos como a acetoseringona e a acetovanilona também se encontram presentes numa concentração elevada, sendo os compostos do grupo cinâmico aqueles que se encontram presentes em menor quantidade. Estes dados indicam maior contribuição de plantas lenhosas, como acontecia nos solos minerais.

Para além do conteúdo fenólico, foram também determinados os parâmetros da lenhina que se encontram apresentados na Tabela 17.

Tabela 17– Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis em cada solo fertilizado com lamas e limite de confiança a 95 % (n=6)

Parâmetros da Lenhina	Solo 6	Solo 23	Solo 33
PON/P	$0.315 \pm 0.008$	$0.351 \pm 0.009$	$0.303 \pm 0.008$
P/(V+S)	$0.218 \pm 0.005$	$0.241 \pm 0.005$	$0.263 \pm 0.005$
S/V	$0.44 \pm 0.01$	$0.40 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.01$
C/V	$0.124 \pm 0.008$	$0.112 \pm 0.008$	$0.059 \pm 0.008$
(Ad/Al) <sub>p</sub>	n.d.	n.d.	n.d.
(Ad/Al) <sub>v</sub>	$0.47 \pm 0.02$	$0.35 \pm 0.01$	$0.25 \pm 0.01$
(Ad/Al) <sub>s</sub>	$0.29 \pm 0.07$	$0.25 \pm 0.09$	$0.35 \pm 0.08$

n.d.: não determinado

Os valores calculados para cada parâmetro da lenhina originam resultados semelhantes aos obtidos para os solos com fertilização mineral. Razões baixas de PON/P, inferior a 1, sugerem a existência de uma fonte adicional de fenóis do grupo *p*-hidroxilo, para além da lenhina, ou seja, indicam a existência de uma contribuição de plantas herbáceas. No entanto, os baixos valores da razão C/V indicam que essa contribuição é relativamente pequena [13].

A razão S/V, tal como no caso anterior, indica-nos que a matéria orgânica em estudo deriva principalmente de plantas gimnospermas [8].

No que diz respeito ao estado de degradação da matéria orgânica, podemos verificar, através das baixas razões de ácido/aldeído e de  $P/(V+S)$ , a existência de uma matéria orgânica com um baixo grau de degradação, uma vez que estas razões aumentam com o estado de degradação [10, 11].

#### 5.2.4. Solos fertilizados com estrume animal

O conteúdo fenólico dos solos 16, 27 e 39, sujeitos a uma fertilização com estrume animal (FYM), foi analisado e os electroferogramas, de uma das réplicas de cada uma das amostras, encontram-se apresentados na Figura 14.

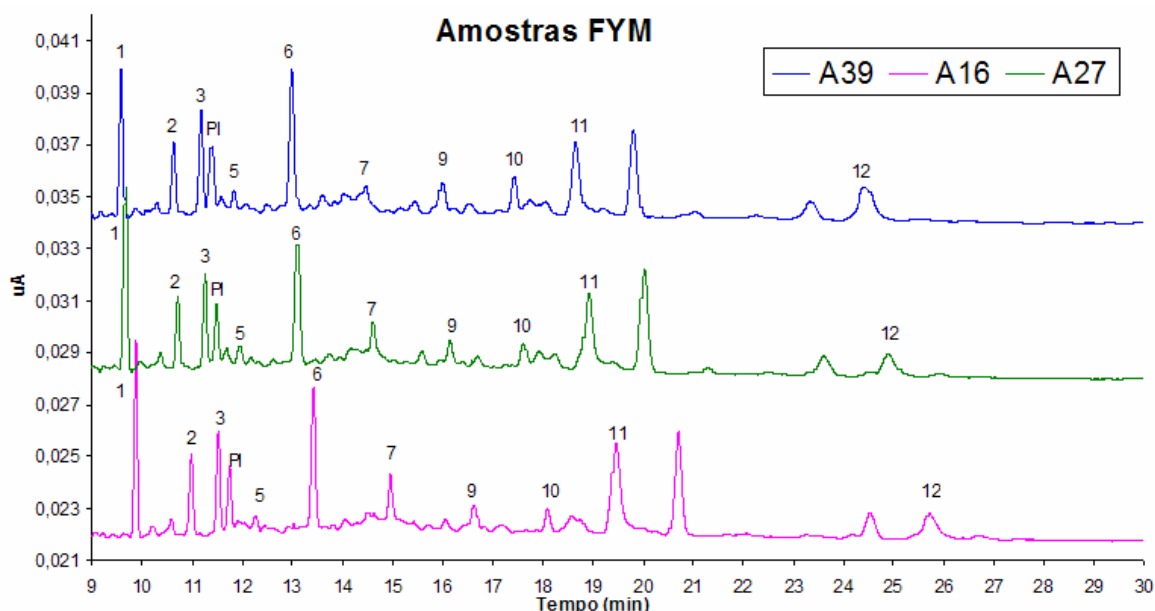


Figura 14 – Electroferograma de três amostras de solo fertilizado com estrume de animais após a degradação oxidativa com  $\text{CuO}$  e com padrão interno  $5,00 \times 10^{-5}$  M. Identificação dos picos: (1) Acetoseríngona, (2) Acetovanilona, (3) Seringaldeído, (PI) Etilvanilina, (5) *p*-hidroxiacetofenona, (6) Vanilina, (7) Ácido Séríngico, (9) *p*-hidroxibenzaldeído, (10) Ácido *p*-cumárico, (11) Ácido Vanílico e (12) Ácido *p*-hidroxibenzóico

A partir dos electroferogramas foram determinadas as áreas dos picos e obtidas as concentrações de cada composto presente na amostra. Os resultados encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 – Resumo dos resultados para cada fenol obtido nos solos sujeitos a uma fertilização com estrume animal e limite de confiança a 95 % (n=6)

<b>Composto</b>	<b>Solo 16</b> µg/g mat. org.	<b>Solo 27</b> µg/g mat. org.	<b>Solo 39</b> µg/g mat. org.
Acetoseríngona	1026 ± 14	974 ± 14	930 ± 11
Acetovanilona	440 ± 4	380 ± 3	448 ± 4
Seringaldeído	457 ± 7	400 ± 7	518 ± 7
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	92 ± 2	74 ± 2	81 ± 2
Vanilina	627 ± 7	525 ± 5	725 ± 8
Ác. Serínico	174 ± 12	140 ± 12	116 ± 14
Ac. Ferúlico	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	168 ± 4	165 ± 4	237 ± 5
Ac. <i>p</i> -cumárico	91 ± 7	70 ± 7	146 ± 8
Ac. Vanílico	335 ± 11	257 ± 8	244 ± 8
Ac. <i>p</i> -hidroxibenzóico	108 ± 4	99 ± 3	185 ± 3
<b>Total</b>	<b>3519 ± 26</b>	<b>3085 ± 24</b>	<b>3630 ± 25</b>

n.d.: não detectado

Os resultados obtidos para estes solos, fertilizados com estrumes de animais, apresentam valores, de um modo geral, muito mais elevados que os outros solos. Nestes solos, o único composto que não foi detectado foi o ácido ferúlico, que também já não tinha sido detectado nos solos com fertilização mineral. A acetoseríngona foi o composto presente em maior quantidade. No entanto, os compostos da família seringilo e vanílico apresentaram concentrações bastante elevadas indicando uma grande contribuição de plantas lenhosas.

Para além do conteúdo fenólico, foram também determinados os parâmetros da lenhina que se encontram apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis em cada solo fertilizado com estrume animal e limite de confiança a 95 % (n=6)

<b>Parâmetros da Lenhina</b>	<b>Solo 16</b>	<b>Solo 27</b>	<b>Solo 39</b>
PON/P	0.238 ± 0.006	0.207 ± 0.006	0.154 ± 0.004
P/(V+S)	0.163 ± 0.003	0.172 ± 0.003	0.227 ± 0.003
S/V	0.984 ± 0.01	1.08 ± 0.02	0.92 ± 0.01
C/V	0.063 ± 0.004	0.059 ± 0.005	0.100 ± 0.005
(Ad/Al) <sub>p</sub>	0.57 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.69 ± 0.02
(Ad/Al) <sub>v</sub>	0.48 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.31 ± 0.01
(Ad/Al) <sub>s</sub>	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.21 ± 0.03

n.d.: não determinado

Quando analisamos os resultados obtidos para os parâmetros da lenhina verificamos algumas semelhanças com os solos já analisados. Nomeadamente, verificamos a existência de valores baixos de PON/P, indicando uma contribuição de tecidos não lenhosos, no entanto, o facto de a razão C/V ser também bastante baixa, indica-nos que essa contribuição é bastante reduzida [13]. No que diz respeito ao estado de degradação da matéria orgânica, também é possível verificar, através das baixas razões de ácido/aldeído e de P/(V+S), que os solos apresentam um baixo grau de degradação [10, 11].

No entanto, existe um parâmetro que apresenta valores diferentes nestes solos, quando comparados com os solos anteriores, a razão S/V. Neste caso, esta razão apresenta valores bastante mais altos, chegando mesmo a ser superior a uma unidade no solo 27, indicando-nos uma contribuição de plantas angiospérmicas superior à existente nos restantes solos [8].

#### 5.2.5. Solos fertilizados com composto de lixos domésticos

O conteúdo fenólico dos solos 7, 19 e 24, sujeitos a uma fertilização com composto (COM), foi analisado e os electroferogramas, de uma das réplicas de cada uma das amostras, encontram-se na Figura 15.

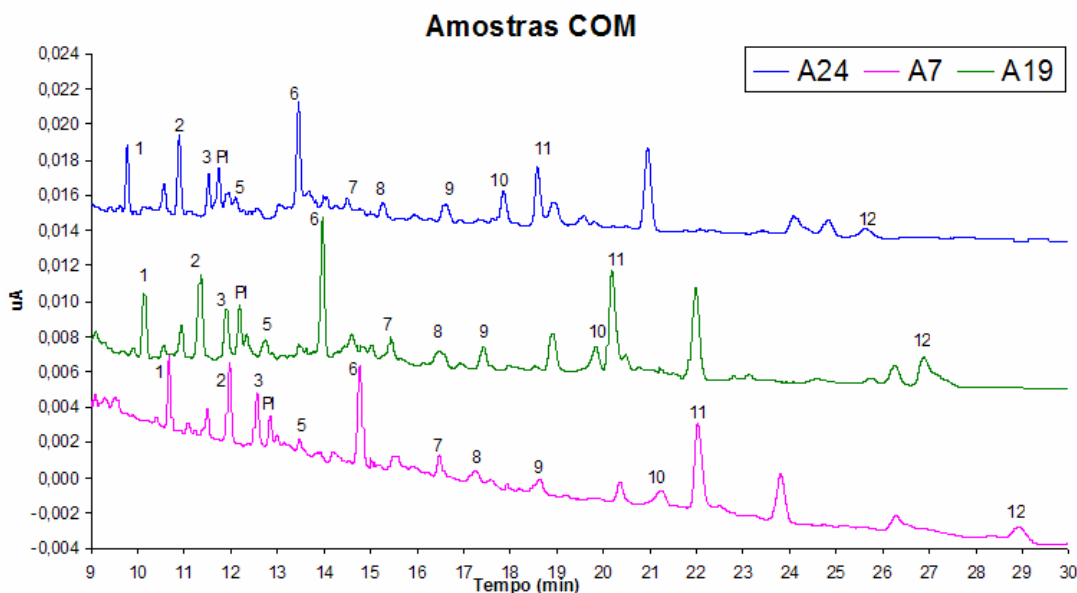


Figura 15 – Electroferograma de três amostras de solo fertilizado com composto após a degradação oxidativa com CuO e com padrão interno  $5.00 \times 10^{-5}$  M. Identificação dos picos: (1) Acetoseríngona, (2) Acetovanilona, (3) Seringaldeído, (PI) Etilvanilina, (5) *p*-hidroxiacetofenona, (6) Vanilina, (7) Ácido Serínico, (8) Ácido Ferúlico, (9) *p*-hidroxibenzaldeído, (10) Ácido *p*-cumárico, (11) Ácido Vanílico e (12) Ácido *p*-hidroxibenzóico

A partir dos electroferogramas, foram determinadas as áreas dos picos e obtidas as concentrações de cada composto presente na amostra. Os resultados encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 – Resumo dos resultados para cada fenol obtido nos solos sujeitos a uma fertilização com composto e limite de confiança a 95 % (n=6)

<b>Composto</b>	<b>Solo 7</b> µg/g mat. org.	<b>Solo 19</b> µg/g mat. org.	<b>Solo 24</b> µg/g mat. org.
Acetoseríngona	469 ± 7	294 ± 4	339 ± 5
Acetovanilona	537 ± 3	402 ± 2	410 ± 2
Seringaldeído	303 ± 4	178 ± 3	152 ± 4
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	135 ± 2	105 ± 1	103 ± 1
Vanilina	627 ± 7	474 ± 5	492 ± 5
Ác. Seríngico	105 ± 6	71 ± 7	59 ± 8
Ac. Ferúlico	106 ± 2	83 ± 3	72 ± 4
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	186 ± 3	106 ± 2	127 ± 3
Ac. <i>P</i> -cumárico	81 ± 4	73 ± 4	93 ± 5
Ac. Vanílico	366 ± 11	321 ± 11	242 ± 7
Ac. <i>P</i> -hidroxibenzóico	127 ± 2	65 ± 2	48 ± 2
Total	3042 ± 18	2172 ± 16	2137 ± 15

A grande diferença destes solos fertilizados com composto, em relação aos analisados anteriormente, é que, neste caso, todos os compostos em estudo se encontram presentes. No entanto, também nestes solos se verifica uma elevada concentração de compostos das famílias seringilo e vanililo, indicando uma grande contribuição de plantas lenhosas, sendo a vanilina o composto que se encontra presente, mais uma vez, em maior quantidade.

Para além do conteúdo fenólico, foram também determinados os parâmetros da lenhina que se encontram na Tabela 21.

Tabela 21 – Resumo dos resultados para os parâmetros da lenhina obtidos com os resultados dos fenóis em cada solo fertilizado com composto e limite de confiança a 95 % (n=6)

<b>Parâmetros da Lenhina</b>	<b>Solo 7</b>	<b>Solo 19</b>	<b>Solo 24</b>
PON/P	0.288 ± 0.004	0.367 ± 0.006	0.351 ± 0.007
P/(V+S)	0.243 ± 0.003	0.206 ± 0.003	0.215 ± 0.003
S/V	0.481 ± 0.007	0.381 ± 0.007	0.401 ± 0.008
C/V	0.107 ± 0.003	0.116 ± 0.004	0.130 ± 0.005
(Ad/Al) <sub>p</sub>	0.60 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.34 ± 0.02
(Ad/Al) <sub>v</sub>	0.53 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.44 ± 0.01
(Ad/Al) <sub>s</sub>	0.32 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.05

Neste tipo de fertilização, os resultados obtidos para cada parâmetro da lenhina são também semelhantes aos observados nos solos com fertilização mineral e fertilizados com estrume. Verifica-se a existência de uma fonte adicional de fenóis do grupo *p*-hidroxilo, para além dos que resultam da degradação da lenhina, devido às baixas razões observadas para o parâmetro PON/P. No entanto, também neste caso, e através da observação do baixo valor obtido para a razão C/V, verificamos que a contribuição, por parte de tecidos não lenhosos, não é muito elevada [13]. Para além do tipo de tecidos que deu origem à matéria orgânica, através do parâmetro S/V conseguimos identificar em que tipo de plantas teve origem a matéria orgânica existente no solo, assim valores baixos para estas razões indicam uma origem predominante em plantas gimnospérmicas [8].

No que diz respeito ao estado de degradação da matéria orgânica, podemos verificar que tanto as razões ácido/aldeído baixas e  $P/(V+S)$  baixas indicam um baixo grau de degradação, uma vez que estas razões aumentam com o estado de degradação [10, 11].

### 5.2.6. Comparação dos solos com base no conteúdo em fenóis

De modo a comparar, de uma forma mais simples, cada uma das amostras de solos de cada tipo de fertilização, apresentamos, na Tabela 22, as percentagens relativas de cada composto no solo.

Tabela 22 – Percentagem relativa de cada fenol presente no solo com limite de confiança a 95 % (n=6)

Composto	Fertilização com estrume			Fertilização com composto		
	Solo 16 (%)	Solo 27 (%)	Solo 39 (%)	Solo 7 (%)	Solo 19 (%)	Solo 24 (%)
Acetoseríngona	29.1 ± 0.4	31.6 ± 0.4	25.6 ± 0.3	15.4 ± 0.2	13.5 ± 0.2	15.9 ± 0.2
Acetovanilona	12.5 ± 0.1	12.3 ± 0.1	12.3 ± 0.1	17.67 ± 0.09	18.5 ± 0.1	19.2 ± 0.1
Seringaldeído	13.0 ± 0.2	13.0 ± 0.2	14.3 ± 0.2	10.0 ± 0.1	8.2 ± 0.2	7.1 ± 0.2
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	2.62 ± 0.05	2.39 ± 0.05	2.24 ± 0.05	4.43 ± 0.06	4.85 ± 0.05	4.80 ± 0.06
Vanilina	17.8 ± 0.2	17.0 ± 0.2	20.0 ± 0.2	20.6 ± 0.2	21.8 ± 0.2	23.0 ± 0.2
Ác. Seríngico	5.0 ± 0.4	4.5 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.5 ± 0.2	3.3 ± 0.3	2.8 ± 0.4
Ac. Ferúlico	n.d.	n.d.	n.d.	3.47 ± 0.08	3.8 ± 0.1	3.4 ± 0.2
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	4.8 ± 0.1	5.4 ± 0.1	6.5 ± 0.1	6.11 ± 0.09	4.9 ± 0.1	6.0 ± 0.1
Ac. <i>p</i> -cumárico	2.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2	4.0 ± 0.2	2.7 ± 0.1	3.4 ± 0.2	4.4 ± 0.2
Ac. Vanílico	9.5 ± 0.3	8.3 ± 0.3	6.7 ± 0.2	12.0 ± 0.4	14.8 ± 0.5	11.3 ± 0.3
Ac. <i>p</i> -hidroxibenzóico	3.1 ± 0.1	3.21 ± 0.09	5.09 ± 0.09	4.16 ± 0.05	3.00 ± 0.08	2.3 ± 0.1

Composto	Fertilização Mineral			Fertilização com lamas		
	Solo 2 (%)	Solo 29 (%)	Solo 37 (%)	Solo 6 (%)	Solo 23 (%)	Solo 33 (%)
Acetoseríngona	18.9 ± 0.5	21.7 ± 0.8	16.7 ± 0.3	15.9 ± 0.4	15.9 ± 0.4	17.7 ± 0.4
Acetovanilona	14.6 ± 0.1	12.6 ± 0.2	12.2 ± 0.1	14.9 ± 0.1	16.7 ± 0.1	16.9 ± 0.1
Seringaldeído	12.4 ± 0.4	11.4 ± 0.6	9.2 ± 0.2	9.0 ± 0.3	7.8 ± 0.3	8.0 ± 0.3
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	7.6 ± 0.1	6.0 ± 0.2	4.92 ± 0.07	4.42 ± 0.08	5.4 ± 0.1	5.2 ± 0.1
Vanilina	24.9 ± 0.3	20.8 ± 0.4	22.5 ± 0.2	24.5 ± 0.3	26.4 ± 0.3	27.4 ± 0.3
Ác. Seríngico	n.d.	n.d.	n.d.	2.8 ± 0.7	2.1 ± 0.7	3.0 ± 0.7
Ac. Ferúlico	n.d.	n.d.	n.d.	2.7 ± 0.3	2.0 ± 0.3	1.7 ± 0.3
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	8.4 ± 0.3	8.9 ± 0.4	7.3 ± 0.2	8.6 ± 0.2	9.0 ± 0.2	10.7 ± 0.2
Ac. <i>P</i> -cumárico	5.2 ± 0.5	7.0 ± 0.8	6.5 ± 0.3	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4	1.8 ± 0.4
Ac. Vanílico	4.7 ± 0.5	8.2 ± 0.8	14.8 ± 0.5	12.7 ± 0.4	10.3 ± 0.4	7.7 ± 0.4
Ac. <i>p</i> -hidroxibenzóico	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.4	5.8 ± 0.1	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: não determinado

No gráfico, apresentado na Figura 16, encontram-se representadas as percentagens médias para cada tipo de fertilização, bem como o desvio padrão, obtido através do resultado das análises dos solos, sujeitos ao mesmo tipo de fertilização.



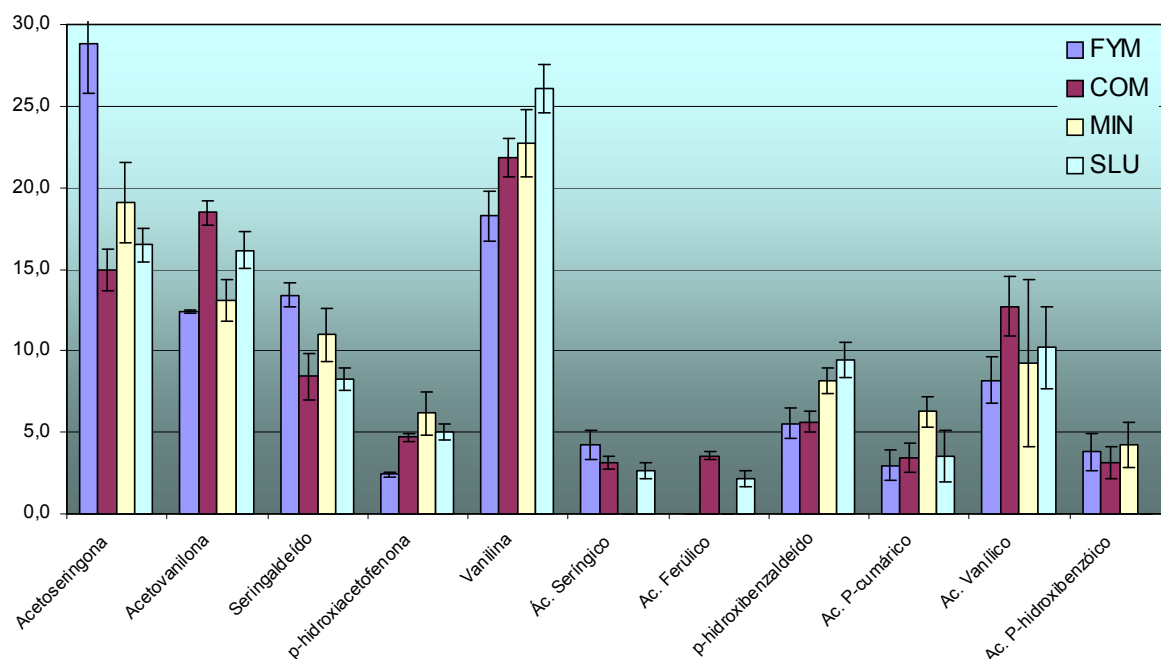


Figura 16 – Percentagem média de cada fenol presente em cada tipo de fertilização (n=3) com a representação da respectiva barra do desvio padrão

Pela análise do gráfico, é possível verificar bastantes semelhanças, no que diz respeito ao conteúdo fenólico presente em cada tipo de fertilização. No entanto, também é possível verificar o facto de os solos fertilizados com estrumes apresentarem uma concentração de acetoseringona superior ao dos restantes solos, que por sua vez apresentam maiores quantidades de vanilina. O outro facto observado é a presença de todos os fenóis em estudo nos solos fertilizados com composto, ausência de ácido p-hidroxibenzóico apenas nos solos fertilizados com lamas e ausência de ácido ferúlico nos solos fertilizados com estrumes e também no solo mineral, apresentando este último também uma ausência de ácido serínigico.

Uma outra forma de analisar os resultados obtidos é através da representação gráfica das razões entre os fenóis seríngico e vanílico (S/V) e das razões entre os fenóis cinamilo e vanílico (C/V). Este gráfico bi-dimensional permite-nos comparar amostras diferentes em termos de contribuição dos diferentes grupos de plantas vasculares nas amostras. Na Figura 17, encontra-se a representação gráfica das razões S/V vs. C/V das amostras de solo sujeitos a diferentes tipos de fertilização, bem como os valores para tecidos de plantas lenhosas e não lenhosas, gimnospérmicas e angiospérmicas, retirados da literatura [8].

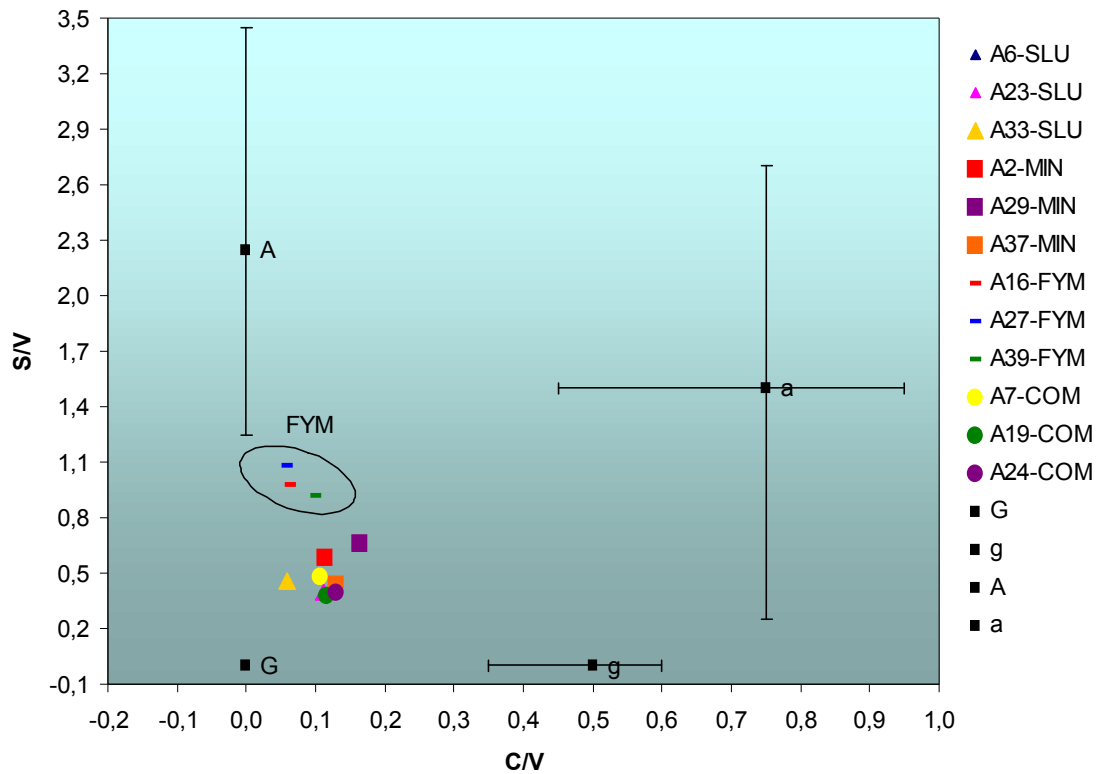


Figura 17 – Representação dos valores S/V vs. C/V de todas as 12 amostras de solo analisadas, bem como os valores para tecidos de gimnospérmicas lenhosas (G), gimnospérmicas não lenhosas (g), angiospérmicas lenhosas (A) e angiospérmicas não lenhosas (a).

A representação gráfica das nossas amostras mostra uma contribuição de vários tecidos, indicando que provêm de uma mistura de diferentes origens. Esta separação bi-dimensional, das diversas fontes de matéria orgânica, indica que, pelo menos, três tipos diferentes de matéria orgânica estiveram na origem destes solos, as angiospérmicas e gimnospérmicas lenhosas e gimnospérmicas não lenhosas. É também facilmente visível que são os tecidos lenhosos os que mais contribuem para a matéria orgânica destes solos e, apesar de os tecidos não lenhosos parecerem não apresentar uma contribuição significativa, a presença de fenóis do grupo cinamilo indica a existência de uma pequena contribuição por parte destes tecidos. Os solos fertilizados com estrumes formam, no gráfico, um pequeno grupo, separado dos restantes solos, onde se nota uma contribuição de tecidos de plantas angiospérmicas lenhosas superior à apresentada nos restantes solos.

Um outra forma de tratamento de dados, que permite efectuar uma redução do número de variáveis e fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do dados, é utilizando uma ferramenta estatística denominada análise em componentes principais (PCA). Trata-se de uma transformação linear, que transforma os dados obtidos num sistema novo de coordenadas, de modo a que a maior variância dos dados seja dada pela primeira coordenada, denominada componente principal 1, a segunda maior variância dada pela segunda coordenada, componente principal 2, etc. A análise em componentes principais pode ser utilizada para efectuar uma redução dimensional de um conjunto de dados, mantendo as características daqueles que apresentam uma maior contribuição na sua variância, mantendo os primeiros componentes principais e ignorando os componentes principais de ordem mais alta [20, 33].

Para aplicar a análise em componentes principais aos resultados obtidos para os nossos fenóis, em cada solo estudado, consideramos o sistema composto por 12 amostras e 11 parâmetros, originando uma matriz 12x11. Essa matriz foi sujeita a uma normalização ( $\text{Matriz MN} = (x - x_{\text{med}})/sd$ , onde  $x$  representa cada valor da matriz,  $x_{\text{med}}$  a média de cada coluna da matriz e  $sd$  o desvio padrão de cada coluna) e, utilizando o Matlab 7.0, efectuou-se a determinação da matriz variância/covariância ( $\text{matriz } C = \text{cov}(\text{MN})$ ).

A partir da matriz variância/covariância e, também, utilizando o Matlab 7.0 calcularam-se os valores próprios e os vectores próprios ( $[v, l] = \text{eig}(C)$ ). Utilizando os valores próprios, calcularam-se as percentagens de variância e de variância acumulada, encontrando-se apresentadas na Tabela 23.

Tabela 23 – Valores próprios para cada componente principal e respectiva percentagem de variância

CP	Valores Próprios	% Variância	% Variância acumulada
1	6,2419	56,7	56,7
2	2,1972	20,0	76,7
3	1,3322	12,1	88,8
4	0,5770	5,2	94,1
5	0,3283	3,0	97,1
6	0,1977	1,8	98,9
7	0,0922	0,8	99,7
8	0,0211	0,2	99,9
9	0,0096	0,1	100,0
10	0,0027	0,0	100,0
11	0,0001	0,0	100,0

Como o objectivo da aplicação desta análise é redimensionar os dados iniciais, de forma a obtermos componentes que expliquem a maior parte da variância, temos que escolher o número de componentes principais a utilizar. Apesar de não existir nenhuma regra universal, relativamente ao número de componentes principais a utilizar, esta decisão passa por um julgamento pessoal e intrínseco à natureza e finalidade dos dados, podendo-se basear a nossa decisão nos seguintes critérios:

1. Podem-se excluir os componentes necessários, de modo a conseguir explicar uma certa variância cumulativa, estabelecida à partida, como por exemplo 80 %.
2. Podem-se excluir os componentes cujos valores são inferiores à média, isto é, menores que 1, no caso de se usarem valores normalizados (*Critério de Kaiser*).
3. É também possível efectuar-se a representação gráfica de cada valor próprio, associado a cada componente principal, versus o número do respectivo componente principal, que se domina por gráfico “scree” (Figura 18). A escolha do número de componentes principais, neste caso, é feita através da localização de uma variação brusca no gráfico, a partir do qual o valor próprio tende a apresentar um valor semelhante de uns componentes principais para outros. O número de componentes principais a utilizar é dado pelo ponto a partir do qual aparece um patamar.

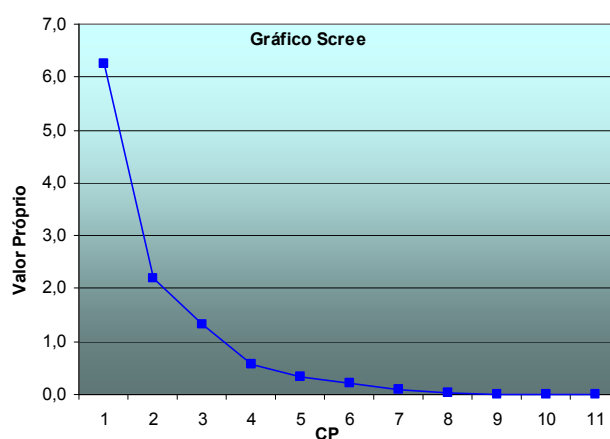


Figura 18 – Representação dos valores próprios – “Scree Plot”

Através da observação do gráfico, podemos verificar que o patamar se atinge apenas a partir do 5º componente principal, devendo ser este o número de componentes principais recomendado. No entanto, e apesar de com 5 componentes principais conseguirmos

explicar 97.1% da variância total, com este número de componentes principais não conseguimos efectuar uma representação gráfica, que nos permita visualizar a distribuição dos resultados. Como com três componentes principais (CP1, CP2 e CP3) conseguimos explicar cerca de 89 % da variância total do sistema (que é um valor perfeitamente aceitável) e a visualização gráfica torna-se perfeitamente possível, foi este o número de componentes principais adoptado.

Assim, temos as seguintes coordenadas para os 3 primeiros componentes principais:

$$\text{CP1} = 0.33391 \cdot \text{Acetoseríngona} + 0.34782 \cdot \text{Acetovanilona} + 0.36294 \cdot \text{Seringaldeído} + 0.14381 \cdot p\text{-hidroxiacetofenona} + 0.38464 \cdot \text{Vanilina} + 0.31893 \cdot \text{Ác. Serínico} + 0.014215 \cdot \text{Ác. Ferúlico} + 0.31375 \cdot p\text{-hidroxibenzaldeído} + 0.23048 \cdot \text{Ác. } p\text{-cumárico} + 0.30764 \cdot \text{Ác. Vanílico} + 0.34503 \cdot \text{Ác. } p\text{-hidroxibenzóico} \quad (\text{II-3})$$

$$\text{CP2} = 0.31197 \cdot \text{Acetoseríngona} - 0.27803 \cdot \text{Acetovanilona} + 0.24961 \cdot \text{Seringaldeído} - 0.50656 \cdot p\text{-hidroxiacetofenona} - 0.075816 \cdot \text{Vanilina} + 0.072247 \cdot \text{Ác. Serínico} - 0.62447 \cdot \text{Ác. Ferúlico} + 0.09493 \cdot p\text{-hidroxibenzaldeído} + 0.090919 \cdot \text{Ác. } p\text{-cumárico} - 0.28644 \cdot \text{Ác. Vanílico} + 0.078752 \cdot \text{Ác. } p\text{-hidroxibenzóico} \quad (\text{II-4})$$

$$\text{CP3} = -0.20924 \cdot \text{Acetoseríngona} - 0.1989 \cdot \text{Acetovanilona} - 0.085176 \cdot \text{Seringaldeído} + 0.28495 \cdot p\text{-hidroxiacetofenona} - 0.0080079 \cdot \text{Vanilina} - 0.49961 \cdot \text{Ác. Serínico} - 0.21689 \cdot \text{Ác. Ferúlico} + 0.057421 \cdot p\text{-hidroxibenzaldeído} + 0.649 \cdot \text{Ác. } p\text{-cumárico} + 0.049886 \cdot \text{Ác. Vanílico} + 0.32328 \cdot \text{Ác. } p\text{-hidroxibenzóico} \quad (\text{II-5})$$

Após a obtenção das equações para cada componente principal considerado, substituiu-se o valor de cada composto, em cada amostra, pelo valor apresentado na matriz normalizada e obtêm-se seguintes coordenadas para cada amostra apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24 – Valores dos 2 primeiros componentes principais obtidos para cada amostra

Amostras	CP1	CP2	CP3
A6 - SLU	-1,6977	-0,069872	-0,4222
A23 - SLU	-2,1099	-0,0087103	-0,21065
A33 - SLU	-1,5360	-0,060804	-1,0912
A2 - MIN	-2,1583	0,34527	1,0021
A29 - MINI	-4,1857	1,6319	0,083065
A37 - MIN	0,83277	-0,12235	2,8979
A16 - FYM	3,0975	1,0778	-1,0721
A27 - FYM	1,6817	1,6441	-1,3272
A39 - FYM	4,1019	1,8485	0,82786
A7 - COM	2,5808	-2,8181	-0,26958
A19 - COM	-0,26706	-1,9853	-0,40388
A24 - COM	-0,34001	-1,4825	-0,014174

A representação gráfica do componente principal 1 em função do componente principal 2 e do componente principal 3, para cada amostra, encontra-se na Figura 19.

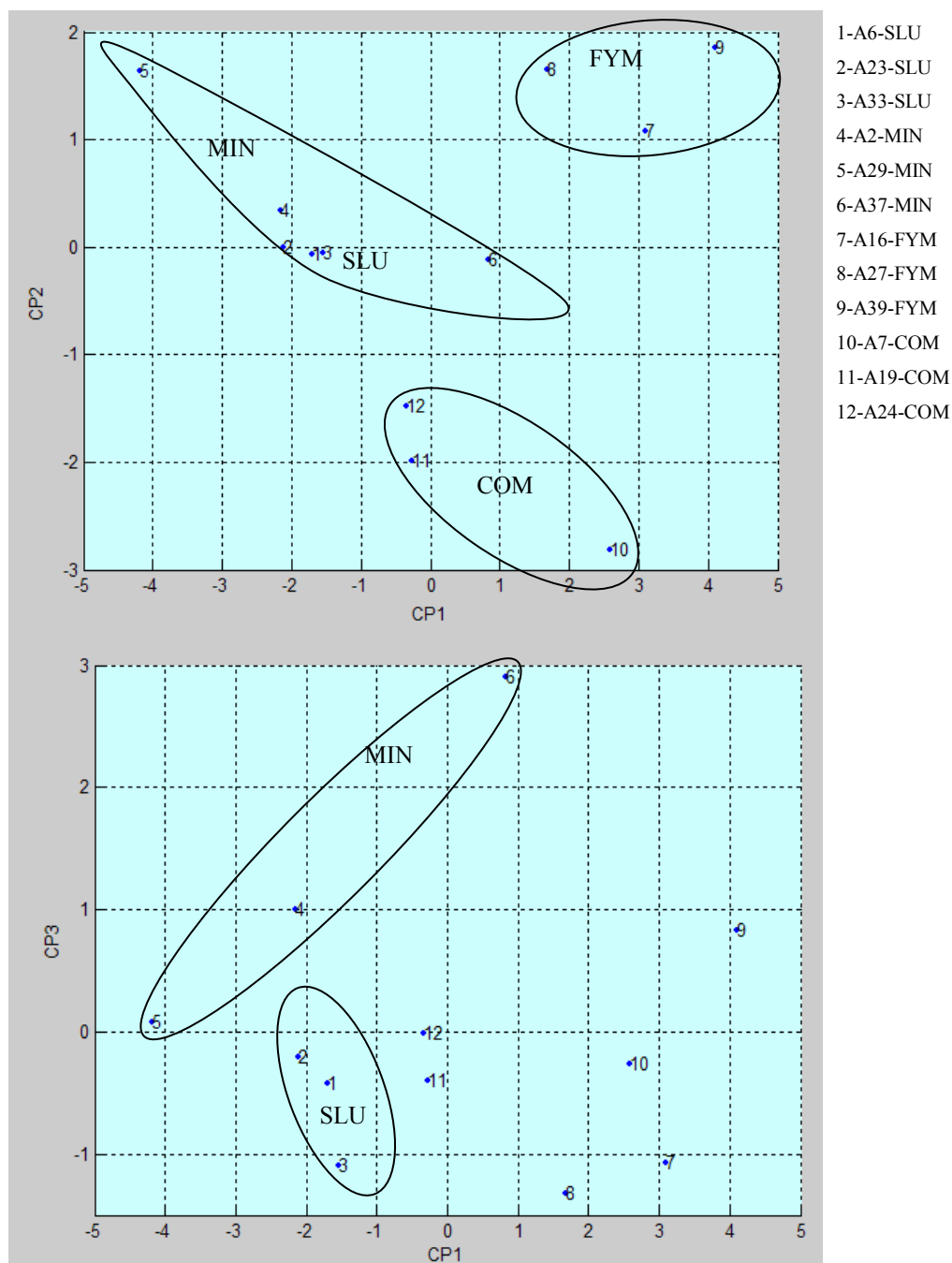


Figura 19 – Representação gráfica do CP1 em função do CP 2 e do CP3 para cada amostra de solo analisada

Utilizando apenas três componentes principais (x,y,z), que explicam 89 % da variância total do sistema, verificamos que a representação dos componentes principais, obtidas para cada amostra, origina uma separação das amostras tendo em conta o tipo de fertilização a

que as amostras foram sujeitas. Na representação do CP1 em função do CP2 (plano xOy), verificamos que os solos fertilizados com estrume (A16, A27 e A39) encontram-se representadas no quadrante superior direito, bastante afastadas de todas as outras amostras, por outro lado, também vemos as amostras fertilizadas com composto (A7, A19 e A24) bastante separadas das amostras das outras duas fertilizações. No que diz respeito aos solos com fertilização mineral (A2, A29 e A37), e aos solos fertilizados com lamas (A6, A23 e A33), encontram-se mais próximas sendo a sua separação no plano xOy complicada. No entanto, quando se faz a representação do CP1 em função do CP3 (plano xOz) conseguimos verificar que as amostras referentes à fertilização com lamas se encontram separadas das amostras referentes à fertilização mineral, formando dois grupos distintos.

Assim, utilizando 3 componentes principais e uma representação com 3 eixos, conseguimos separar as amostras em estudo em quatro grupos distintos, que coincidem com as fertilizações em causa.

### 5.3. Conclusões

Após a análise do conteúdo fenólico nos solos, sujeitos a diferentes tipos de fertilização, tínhamos como objectivo tentar identificar diferenças, que pudessem advir do tipo de fertilização a que tinham sido sujeitos. Para isso, usamos 3 solos de cada tipo de fertilização, tendo sido possível identificar algumas diferenças entre os solos sujeitos a diferentes fertilizações.

Uma vez que em todos solos, os fenóis presentes em maior percentagem são a vanilina (aldeído) e a acetoseringona (cetona), e que os ácidos têm tendência a se encontrarem em baixas concentrações, podemos dizer que estamos perante um matéria orgânica pouco degradada, pois a degradação aumenta com a oxidação das cadeias laterais, ocorrendo a transformação de grupos aldeído/cetona em grupos ácido.

Uma das grandes diferenças observadas, diz respeito à origem da matéria orgânica analisada. Tendo em conta as razões S/V, verificamos que os solos sujeitos a fertilizações com estrume, apresentam valores mais altos do que os outros solos analisados. Esta observação indica-nos que a fertilização com estrume introduziu uma maior quantidade de matéria orgânica oriunda de plantas angiospérmicas. Este tipo de plantas apresentam

sementes que se encontram encerradas num ovário, como é o caso das plantas com flor, frutos, palhas, entre outros. O facto de solos fertilizados com estrumes apresentarem maior contribuição deste tipo de plantas, poderá dever-se ao facto das fertilizações serem feitas com uma mistura de fezes de animais e palhas.

Outro facto observado refere-se à presença ou ausência de alguns compostos. No caso dos solos fertilizados com composto, verifica-se a presença de todos os compostos em estudo, mesmo que, em alguns casos, se encontrem presentes em pequenas quantidades. Os solos sujeitos a fertilização com lamas e os solos fertilizados com estrume não apresentam a totalidade dos compostos, sendo que, no primeiro caso, tínhamos a ausência do ácido p-hidroxibenzóico, enquanto que no segundo, o ácido ferúlico é que se encontrava ausente. Nos solos com fertilização mineral já verificamos a ausência de dois compostos, ácido ferúlico e ácido séríngico.

Utilizando a análise de componentes principais foi possível dividir os solos em quatro grupos diferentes. Este agrupamento final coincidiu com o tipo de fertilização a que os solos foram sujeitos, tendo sido identificados dois grupos distintos (referentes às fertilizações com composto e estrume) no plano xOy e outros dois grupos (referentes às fertilizações mineral e com lamas) separados no plano xOz.









# Análise Termogravimétrica



## 1. OBJECTIVOS

Este trabalho tem como objectivo a determinação das propriedades termogravimétricas dos solos de cada tipo de fertilização. A forma das curvas termogravimétricas e, nomeadamente, as suas derivadas fornecem informação importante relativa à estabilidade térmica das amostras. No presente trabalho, determinou-se o teor de humidade a 60 °C o teor de cinzas. Para além destes parâmetros, prestou-se uma atenção especial aos picos de degradação térmica em cada uma das amostras de solos, com o intuito de encontrar diferenças, que possam estar relacionadas com o tipo de fertilização.

## 2. INTRODUÇÃO

Uma definição generalizada e aceite para análise térmica é: “um grupo de técnicas onde uma propriedade física de uma dada substância e/ou do seu produto de reacção é medido em função da temperatura, enquanto a substância se encontra sujeita a um programa de temperatura controlado” [29].

Na análise termogravimétrica, a massa de uma dada amostra, numa atmosfera controlada, é medida continuamente em função da temperatura ou do tempo, à medida que se aumenta a temperatura da amostra. Um gráfico da massa, ou percentagem de massa, em função do tempo é denominado termograma ou curva de decomposição térmica. Os aparelhos modernos, usados na termogravimetria, consistem numa balança analítica sensível, um forno, um sistema de purga de gás, de modo a fornecer a atmosfera pretendida (inerte ou, por vezes, reactiva), e um computador onde possa ser efectuado o controlo do aparelho e a aquisição de dados [29]. Este tipo de aparelho encontra-se apresentado na Figura 20.

A termogravimetria tem sido utilizada, quase exclusivamente, para quantificar a humidade e a percentagem de cinzas. No entanto, alguns autores têm vindo a utilizar esta técnica para caracterizar e estudar modificações estruturais em substâncias húmicas [34]. A termogravimetria permite avaliar a degradação, oxidação, redução, evaporação, sublimação e outras mudanças que ocorrem nas amostras, que se encontram relacionadas com o calor.



Figura 20 – Aparelho de termogravimetria

Os termogramas e, em particular, as suas primeiras derivadas, que enfatizam as alterações existentes no sinal, fornecem informações importantes acerca da estabilidade térmica das substâncias húmicas. As diferenças observadas nas curvas de decomposição térmica poderão dever-se a diferenças no grau de humificação da matéria orgânica, bem como à existência de caminhos biológicos e químicos diferentes, que possam influenciar a estrutura das substâncias húmicas [34].

### 3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Para a análise termogravimétrica, utilizou-se um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50, acoplado a um computador, através de uma interface TA-50WSI da mesma marca, para programação, aquisição e tratamento de dados. Sabe-se que factores, tais como a velocidade de aquecimento, tamanho das partículas, quantidade e natureza química das amostras, bem como a geometria do cadinho e do forno, têm um papel importante no evoluir da decomposição térmica [34].

O programa de temperaturas, utilizado em todas as análises termogravimétricas das amostras, encontra-se apresentado na Figura 21.

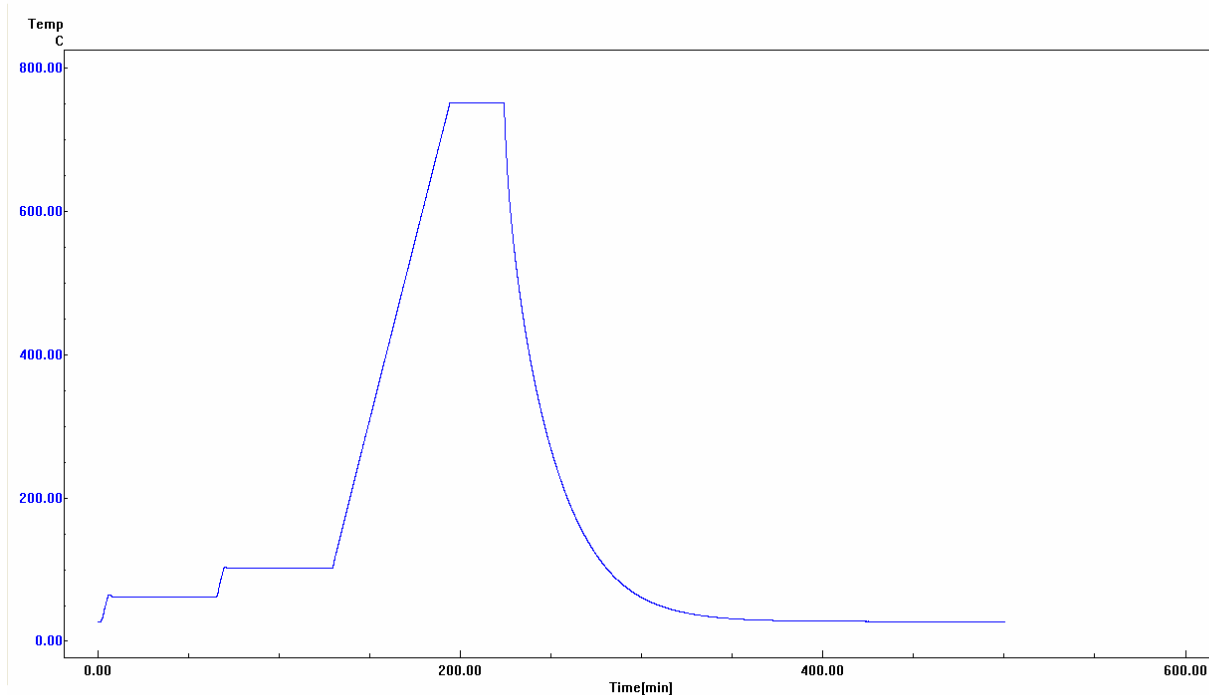


Figura 21 – Programa de temperatura utilizado nas análises termogravimétricas

Como se pode ver na Figura 21, a temperatura aumenta até ao 60 °C, a uma taxa de 10 °C/min, mantendo-se a essa temperatura durante 1 hora. Após esse tempo, volta a subir até aos 100 °C, também a uma taxa de 10 °C/min, mantendo-se mais uma vez a essa temperatura durante 1 hora. Por fim, a temperatura atinge os 750 °C também a uma taxa de 10 °C/min, mantendo os 750 °C durante 30 min.

O programa, utilizado em todas as análises termogravimétricas das amostras e ensaios do branco, tinha como objectivo a obtenção de resultados para o estudo da degradação térmica, determinação da humidade a 60 °C e das cinzas a 750 °C. As rampas de 10 °C/min têm sido utilizadas, por diversos autores, neste tipo de análises [35, 36]. Utilizaram-se os patamares de 60 °C e 100 °C durante uma hora cada, com o intuito de se efectuar a determinação da humidade a uma destas temperaturas de secagem.

Utilizaram-se cerca de 15 mg de cada amostra de solo, tratados com HCl 1 M, guardada numa atmosfera condicionada por gel de sílica, de modo a garantir o mesmo grau de humidade atmosférica em todas as amostras. O arraste dos gases, desenvolvidos durante a degradação térmica, foi efectuado através de uma corrente de ar K a um caudal de 20 ml/min. Tanto os brancos como a degradação das amostras foram feitos em cadinhos de platina.

Realizaram-se 7 réplicas do branco e 3 réplicas de cada uma das amostras.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos aspectos fundamentais a ter em conta é a variação do peso medido pela microbalança, relativamente ao real. Esta variação observada deve-se à utilização de uma corrente oxidante de ar K, que exerce pressão sobre o cadinho e a amostra. Assim, a mudança de densidade da atmosfera que rodeia a amostra no cadinho, devido às mudanças de temperatura, originam variações de impulsão sofrida pelo porta amostras e pela própria amostra provocando também variações nos pesos medidos.

Para corrigir estas variações, realizaram-se 7 ensaios em branco, ao longo de todo o período de análise, encontrando-se os resultados na Tabela 25.

Tabela 25 – Valores médios das massas de 7 brancos às temperaturas: inicial, a 60°C e a 750°C, bem como o desvio padrão e o limite de detecção (LOD = branco+3\* desvio padrão)

	<b>Massa aparente (mg)</b>	<b>Massa a 60 °C (mg)</b>	<b>Massa a 750 °C (mg)</b>
Média dos 7 Brancos	0,0006	0,02	0,08
Desvio Padrão	0,0009	0,007	0,007
LOD	0,003	0,04	0,1

A determinação da humidade pode ser efectuada a 60 ou a 100 °C. Por um lado, a determinação efectuada a 60 °C poderá não corresponder à humidade total da amostra, por outro, com a determinação a 100 °C, podemos correr o risco de degradar alguma da sua matéria orgânica. Piccolo e Stevenson (1994) demonstraram, utilizando a espectroscopia de infravermelho, que o aquecimento de ácidos húmicos e de ácidos fúlvicos a 100 °C por um período entre 2 horas e 7 dias, provoca a decomposição de grupos carboxílicos dessas amostras. Assim, optou-se por determinar a humidade a 60 °C. Na Tabela 26, encontram-se os resultados obtidos em cada amostra para a humidade a 60 °C, bem como para o teor em cinzas. Todos os resultados apresentados foram, previamente, corrigidos com os resultados obtidos nos ensaios em branco.

Tabela 26 – Valores da Humidade a 60 °C e Cinzas a 750 °C dos solos, obtidos através da realização de 3 réplicas, bem como o respectivo desvio padrão

	Amostra	Humidade a 60 °C	Cinzas a 750 °C
MIN	S2	2,1 ± 0,2	93,0 ± 0,1
	S37	1,9 ± 0,1	93,4 ± 0,3
	S29	1,3 ± 0,2	94,11 ± 0,02
FYM	S16	2,2 ± 0,8	91,3 ± 0,7
	S27	1,6 ± 0,1	92,9 ± 0,3
	S39	1,4 ± 0,2	94,0 ± 0,3
COM	S19	1,9 ± 0,1	90,4 ± 0,5
	S7	1,61 ± 0,29	91 ± 2
	S24	1,3 ± 0,2	91 ± 1
SLU	S23	1,7 ± 0,1	92,2 ± 0,7
	S6	1,30 ± 0,08	93,3 ± 0,2
	S33	1,4 ± 0,2	93,6 ± 0,1

A observação dos resultados, apresentados na Tabela 26, permite-nos verificar que todos os solos apresentam percentagens de humidade a 60 °C entre 1.3 e 2.2 %.

No que diz respeito ao conteúdo em cinzas, os resultados obtidos apresentam valores já esperados. Ou seja, uma vez que já tinha sido determinada, anteriormente, a percentagem de matéria orgânica, através da combustão a 550 °C, alguns dos resultados obtidos já eram previsíveis.

Os solos que apresentaram menor percentagem de cinzas, cerca dos 90 %, foram os solos sujeitos a uma fertilização com composto. Estes solos, quando sujeitos a uma combustão a 550 °C, originaram perdas de matéria orgânica entre os 8 e os 10 %, estando de acordo com as percentagens de cinzas obtidas (90 a 91 %). Mais uma vez, verificamos que estes solos, sujeitos a fertilizações com composto, apresentam maior percentagem de matéria orgânica do que os outros três solos.

No que diz respeito aos outros solos, sujeitos às outras três fertilizações em estudo, não apresentaram grandes diferenças em relação à percentagem de matéria orgânica obtida. Quando comparamos os resultados obtidos na percentagem de cinzas e na determinação do conteúdo de matéria orgânica, os resultados obtidos são, de um modo geral, concordantes. Nomeadamente, para o solo 39, os resultados obtidos na percentagem de matéria orgânica foi bastante inferior aos obtidos para os outros dois solos da mesma fertilização. Se olharmos para o conteúdo em cinzas, tal facto é também visível, ou seja, o solo 39 apresenta um conteúdo em cinzas superior ao dos outros dois solos sujeitos à mesma fertilização.

A análise dos termogramas, nomeadamente a análise da primeira derivada da curva que traduz a variação da massa ao longo do tempo, permite tirar algumas conclusões relativas à degradação térmica da matéria orgânica dos solos. Nas Figuras 22, 23, 24 e 25 encontram-se os termogramas de cada solo analisado, onde podemos ver as curvas do programa de temperaturas (Temp), os termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA). Na Figura 22, encontramos os termogramas dos solos sujeitos a fertilização mineral, enquanto que, na Figura 23, se encontram os resultados para os solos fertilizados com estrume. Na Figura 24, estão os resultados dos solos fertilizados com composto e, por último, na Figura 25, é possível ver os termogramas dos solos fertilizados com lamas, provenientes de estações de tratamento de águas residuais municipais.

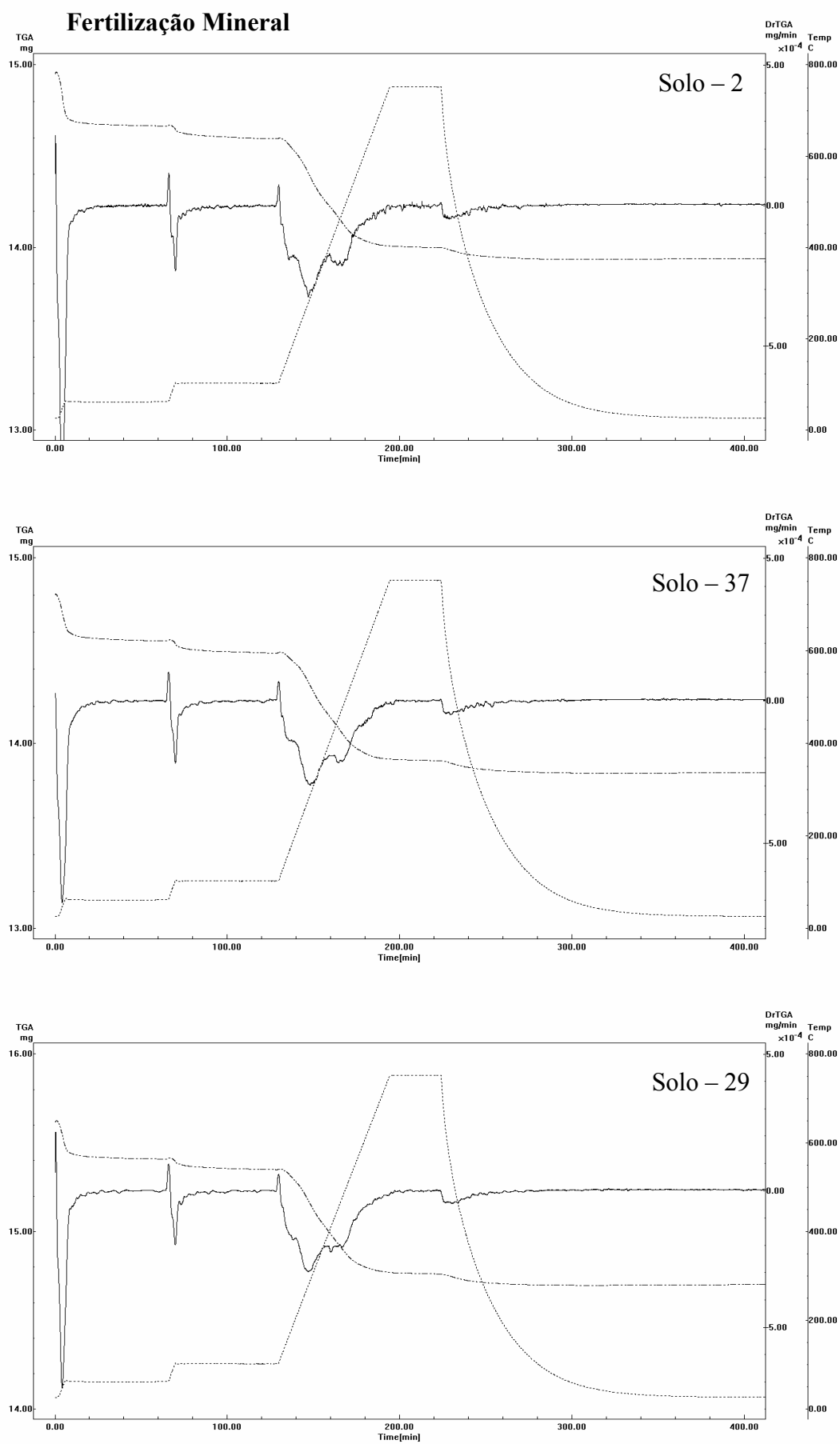


Figura 22 – Curvas do programa de temperatura (Temp), termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA) dos três solos sujeitos a fertilização mineral

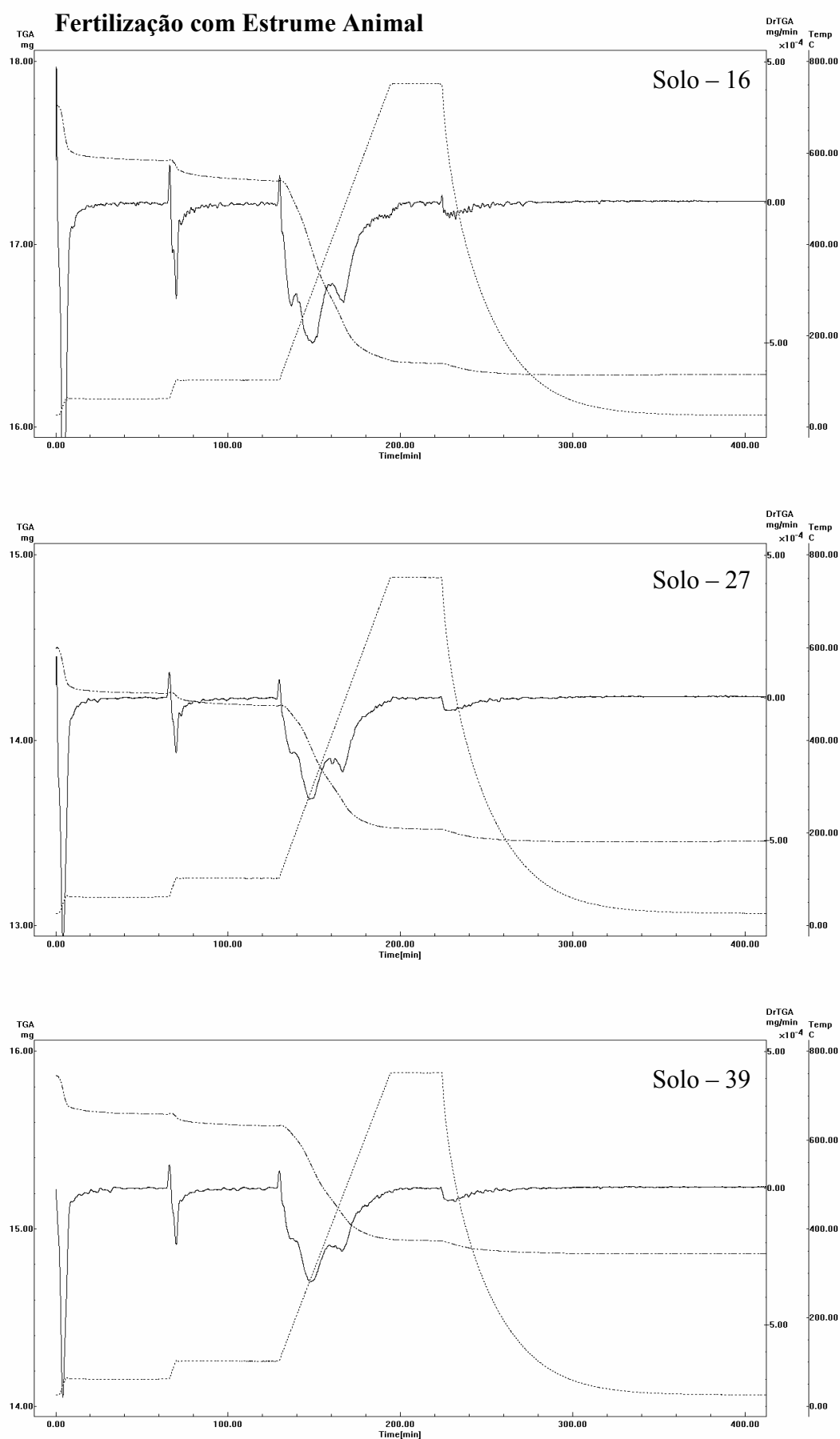


Figura 23 – Curvas do programa de temperatura (Temp), termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA) dos três solos sujeitos a fertilização com estrume animal

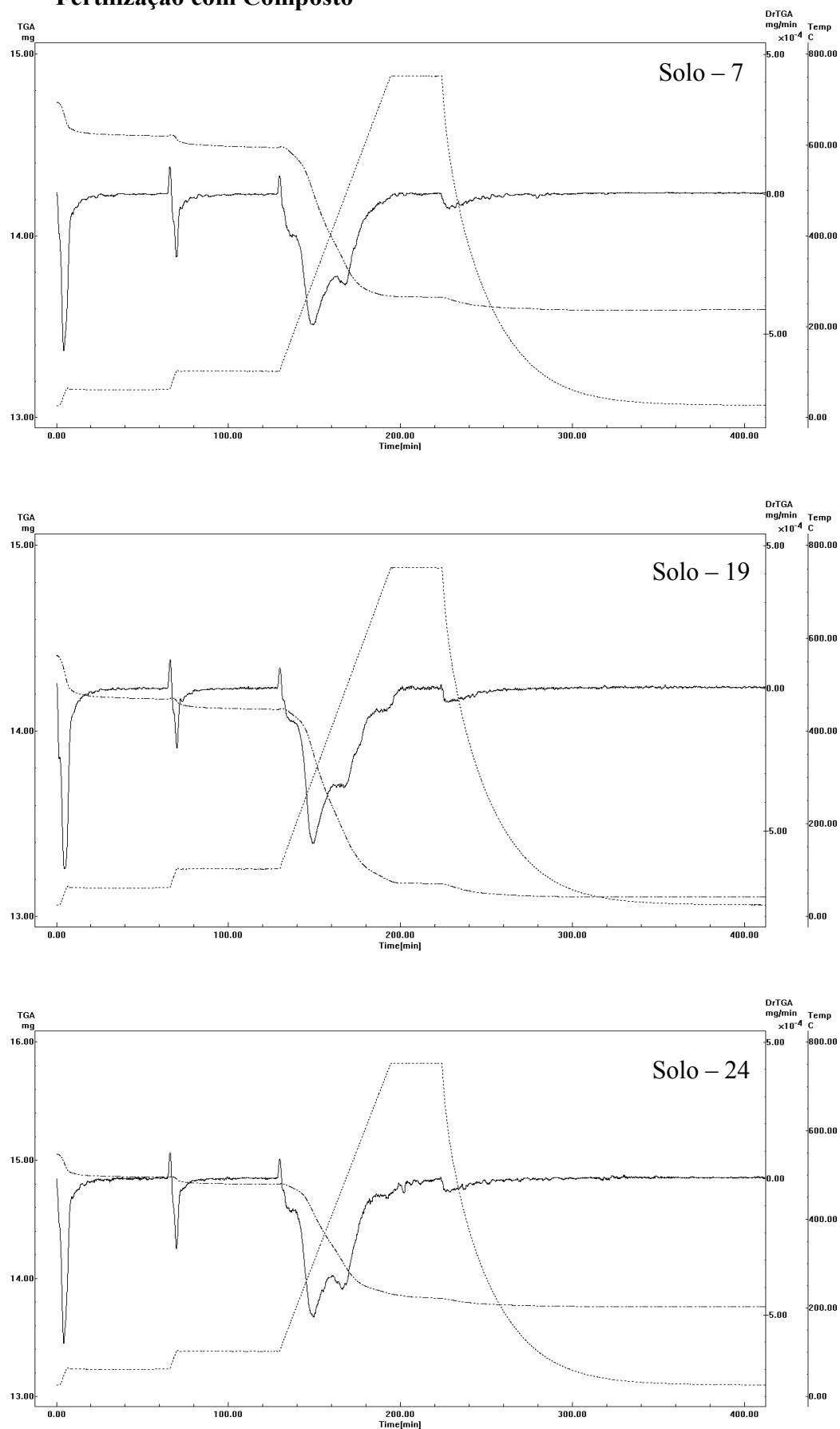
**Fertilização com Composto**

Figura 24 – Curvas do programa de temperatura (Temp), termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA) dos três solos sujeitos a fertilização com composto

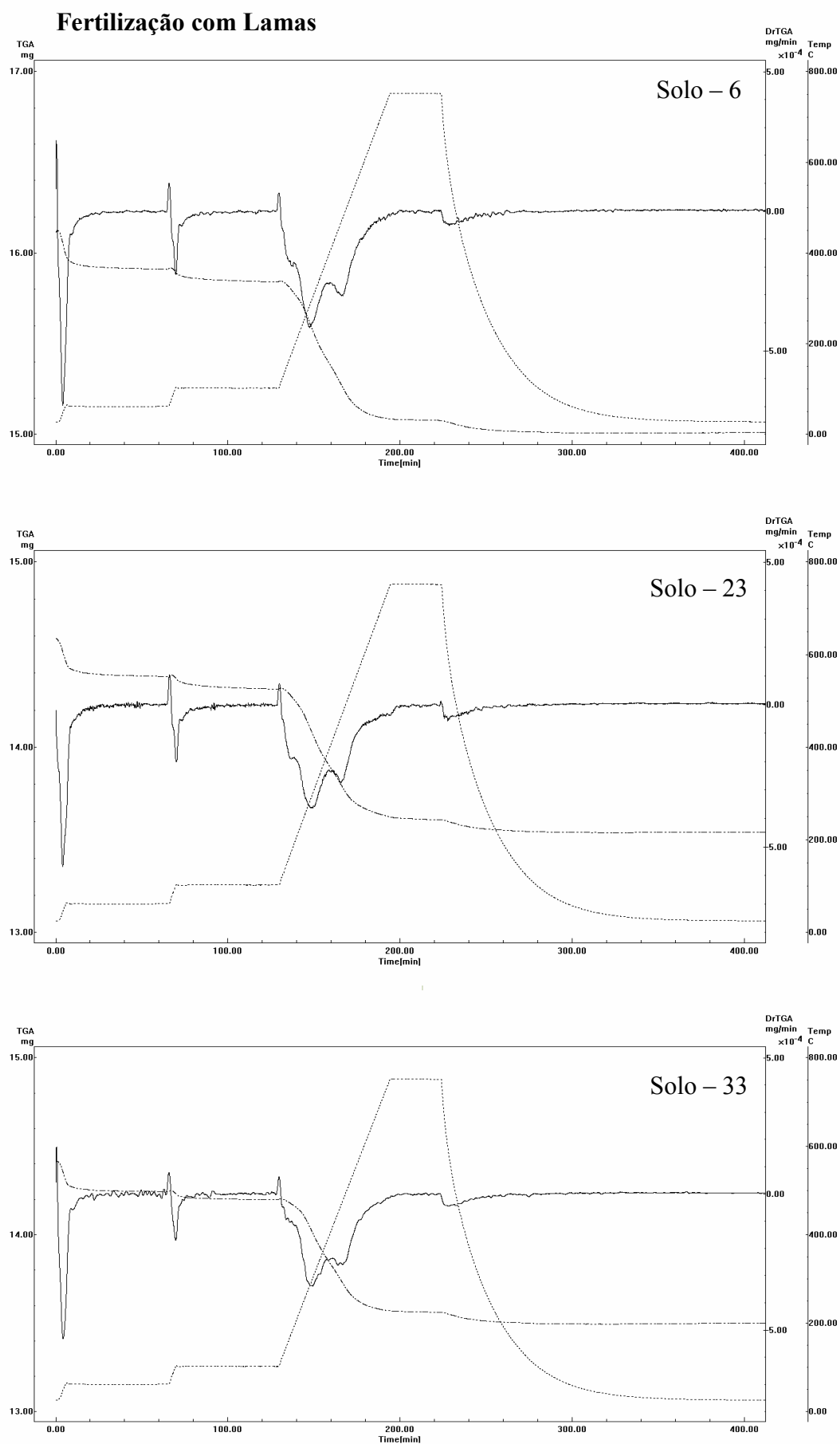


Figura 25– Curvas do programa de temperatura (Temp), termogramas (TGA) e respectivas primeiras derivadas (DrTGA) dos três solos sujeitos a fertilização com lamas de ETAR

A análise das derivadas das curvas termogravimétricas das amostras estudadas, e nas condições anteriormente referidas, permite constatar a existência de 3 picos de degradação.

Pela análise dos termogramas, é possível verificar que até aos 100 °C a perda de peso da amostra é progressiva, admitindo-se, por isso, que essa perda de massa se deva à libertação de água absorvida. Quando a temperatura começa a subir, após a permanência a 100 °C durante 60 min, verifica-se um aumento acentuado da velocidade de degradação da amostra.

Utilizando os dados provenientes da análise das derivadas, foi efectuada a representação gráfica na Figura 26. Neste gráfico, encontramos uma representação da percentagem de matéria orgânica degradada, em função da temperatura, para cada tipo de fertilização.

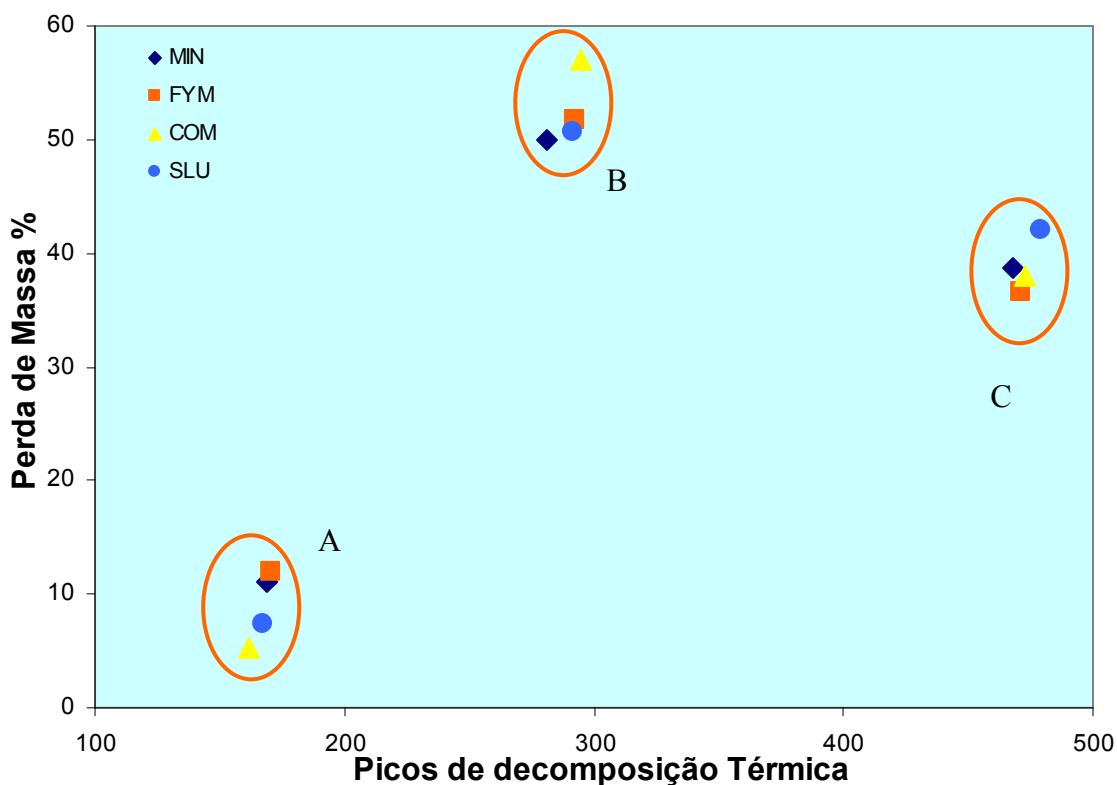


Figura 26 – Máximo dos picos de velocidade de decomposição térmica em função da perda de massa das amostras de solos (média por fertilização; n=3)

A Figura 26 mostra 3 zonas (A, B e C) de picos de degradação nas amostras de solo. Os picos da primeira zona – A – situam-se entre os 150 e os 180 °C. Os solos sujeitos a uma fertilização com composto são os que apresentam uma menor perda de massa a esta



temperatura, mínimo de 5 %, enquanto que os solos sujeitos a uma fertilização com estrume e mineral são os que apresentam maior perda de massa a esta temperatura, chegando aos 12 %.

A segunda zona, zona B, é aquela que apresenta uma maior percentagem de matéria orgânica degradada para todos os solos das diferentes fertilizações. Esta zona situa-se entre os 275 e os 300 °C e encontramos perdas de massa desde os 50% até os 57 %. Os solos que, de um modo geral, apresentam uma maior perda a esta temperatura são os solos que foram sujeitos a fertilizações com composto, enquanto que os restantes solos apresentam valores semelhantes.

A última zona de degradação térmica encontra-se a temperaturas entre os 465 e os 490 °C, onde ocorre entre 37 e 42 % da degradação da matéria orgânica existente nos solos. Nesta última zona, é o solo fertilizado com lamas que apresenta maior taxa de degradação. O solo fertilizado com composto, com estrume e o solo mineral apresentam valores de degradação inferiores a esta temperatura.

Através da Figura 26, foi possível identificar algumas diferenças, no que diz respeito à degradação da matéria orgânica, sugerindo a existência de diferenças na constituição da matéria orgânica de cada solo.

Segundo Pietro e Paola (2004), o processo de decomposição da matéria orgânica ocorre em duas etapas, entre os 210 e 320 °C, dá-se a combustão de hidratos de carbono, enquanto que entre os 400 e os 520 °C ocorre a degradação de estruturas aromáticas. A decomposição térmica de hidratos de carbono, bem como a descarboxilação de grupos ácidos e desidratação de estruturas alifáticas hidroxiladas, com a formação de álcoois de baixo peso molecular, também são referidos por Calace et al (2006), como processos que ocorrem a temperaturas inferiores a 350 °C. Campanella et al (1990), com evidência em espectros de infravermelho, refere temperaturas entre os 260 e 300 °C, como temperaturas que provocam a decomposição de grupos carboxílicos, bem como de grupos metilo e metileno, originam a perda de insaturação e o desaparecimento de ligações C–O dos grupos álcoois e dos polissacarídeos. Calace et al (2006) refere que elevadas decomposições a temperaturas inferiores a 350 °C, sugere um elevado conteúdo em estruturas alifáticas, bem como em grupos funcionais.

No que diz respeito à segunda etapa de degradação, referida por Pietro e Paola (2004), entre os 400 e os 520 °C, também Calace et al (2006) referem a gama de temperaturas entre 380 e 500 °C, como as temperaturas onde se dá a dissociação e quebra de estruturas polinsaturadas e eliminação de hidrogénios, através da ocorrência de quebra de grupos com oxigénios heterocíclicos.

É possível verificar que, os solos que foram sujeitos a uma fertilização mineral e a uma fertilização com estrume, apresentam maior perda de massa a temperaturas mais baixas (160 °C), do que os solos das outras fertilizações e menor perda de massa a temperaturas mais altas (480 °C). Estes resultados dão-nos um indicação que estes tipos de solo deverão apresentar maior conteúdo em grupos funcionais do que os solos sujeitos às outras fertilizações. Os solos fertilizados com composto são os que apresentam maior percentagem de perda de massa a temperaturas que rondam os 300 °C, no entanto, a temperaturas mais altas, próximas dos 480 °C, apresentam uma perda de massa mais baixa. Por este motivo, dá-nos a entender que são solos que apresentam matéria orgânica com pouca aromaticidade, no entanto, e uma vez que apresentam maior perda de massa a temperaturas próximas dos 300 °C, apresentam indicações de conterem maior conteúdo em hidratos de carbono, grupos carboxílicos, bem como de grupos metileno, quando comparados com os restantes solos. Os solos fertilizados com lamas são os que apresentam maior perda de massa a temperaturas mais altas (460 °C), zona atribuída à dissociação e quebra de estruturas polinsaturadas, degradação de estruturas aromáticas e quebra de grupos oxigénio heterocíclicos.



# Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$



## 1. OBJECTIVOS

Este trabalho tem como objectivo a identificação das propriedades espectroscópicas dos solos de cada tipo de fertilização, utilizando a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$ .

## 2. INTRODUÇÃO

A espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido é uma das técnicas mais poderosas na análise da matéria orgânica do solo [43]. A espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi inicialmente estudada em 1957, mas a sua aplicação mais vasta apenas começou nos anos 70 [29]. Apesar de ser fácil a obtenção de um espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido da matéria orgânica do solo, não é fácil a sua obtenção com uma sensibilidade e quantificação optimizada [43]. A necessidade do uso de aparelhos com sensibilidade suficiente para detectar os fracos sinais de RMN dos núcleos de  $^{13}\text{C}$  foi um forte impedimento para a crescente utilização desta técnica [29]. Existe um elevado número de parâmetros de aquisição a ter em conta que, se escolhidos inadequadamente, podem afectar adversamente a sensibilidade e a resolução. No entanto, esta tarefa poderá ser dificultada pelo facto de muitos destes parâmetros se encontrarem interrelacionados [43].

Uma das vantagens do RMN, tal como de muitas outras técnicas espectroscópicas, é de se tratar de uma técnica não destrutiva. O sucesso da aplicação desta técnica depende da obtenção de um sinal suficientemente intenso da frequência de ressonância do núcleo de interesse. A intensidade do sinal é função essencialmente do momento magnético nuclear das espécies em estudo e da abundância das mesmas na amostra. Na espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$ , a baixa intensidade do sinal deve-se, em particular, à baixa abundância natural do isótopo  $^{13}\text{C}$  (1.1 %), tornando-a 6000 vezes menos sensível do que a espectroscopia de RMN de protão [29]. O aumento, de forma significativa, da sensibilidade dos espectros de  $^{13}\text{C}$ , através do uso de magnetes com campo mais alto e das transformadas de Fourier, aliada à técnica de impulsos múltiplos, provocou um crescimento explosivo na aplicação desta técnica [29]. A combinação das técnicas de

desacoplamento dipolar, polarização cruzada e rotação no ângulo mágico, permite obter espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido bem resolvidos [29].

Outros dos problemas do RMN de  $^{13}\text{C}$  em solos deve-se ao reduzido valor de conteúdo em carbono e à presença de materiais paramagnéticos, que ocorrem maioritariamente sob a forma de cátions inorgânicos ou radicais orgânicos livres, provocando, nos espectros de solos obtidos, utilizando a técnica de polarização cruzada com rotação no ângulo mágico (CPMAS), um alargamento das zonas de ressonância e uma perda de sinal [44]. Vários métodos têm sido propostos para o melhoramento da sensibilidade e da resolução dos espectros CPMAS, da matéria orgânica de solos, através da redução dos materiais paramagnéticos. Apesar do Ferro ser o mais problemático deste tipo de materiais, o manganês e o cobre, bem como os radicais orgânicos livres, podem provocar problemas adicionais [44]. De todos os métodos aplicados, os mais populares são os tratamentos químicos, entre eles, o uso de soluções diluídas de ácido fluorídrico [49]. Os tratamentos com ácido fluorídrico melhoram os espectros, não só através da remoção do ferro, mas também através da concentração da matéria orgânica por desmineralização [49]. A remoção química dos materiais paramagnéticos dos solos ou dos componentes do solo é, na maioria das vezes, a única forma possível para produzir espectros CPMAS úteis, em intervalos de tempo razoáveis. No entanto, este tipo de tratamento não deverá comprometer de maneira nenhuma, a composição química original da matéria orgânica do solo [49].

### 3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

#### 3.1. Tratamento da Amostra

Antes da análise espectroscópica de RMN de  $^{13}\text{C}$ , as amostras de solo foram sujeitas a um tratamento repetido com uma solução de ácido fluorídrico a 2 %. Cada tratamento envolve uma agitação de porções de 5 g de solo em 40 mL de solução de ácido fluorídrico 2 %, por períodos de 1 hora (5 vezes), seguidos de períodos de 16 h (3 vezes) e, por fim, um período de 64 h. Entre cada tratamento, as amostras foram centrifugadas, durante 10 min a 4000 rpm, o sobrenadante foi removido e substituído por nova solução de HF a 2 %. No final do tratamento, o resíduo foi lavado 2 vezes com água destilada e liofilizado [43].

#### 3.2. Instrumentação

Os espectros de RMN CPMAS de  $^{13}\text{C}$  das amostras foram obtidos num espectrómetro de Bruker Avance 500 a 125.8 MHz. Todos os espectros foram registados utilizando rotores de 4 mm, com cerca de 100 mg de amostra.

Foram utilizados os seguintes parâmetros de aquisição na obtenção dos espectros:

- rotação da amostra segundo o ângulo mágico à frequência de 7 kHz;
- tempo de contacto de 1 ms;
- tempo de repetição de 5 s;
- duração do impulso de  $90^\circ$  aplicado aos prótons de  $4\mu\text{s}$ ;

Estas condições de aquisição permitiram obter, em poucas horas, espectros com uma boa razão sinal ruído. Contudo, uma vez que se utiliza uma frequência de rotação elevada segundo o ângulo mágico, ocorre uma diminuição na eficiência da polarização cruzada, a qual varia com o ambiente químico dos diferentes carbonos, não sendo assim possível a comparação de áreas de diferentes regiões no mesmo espectro. No entanto, admitindo que os carbonos, com ressonâncias nas mesmas regiões de diferentes espectros, estão sujeitos a ambientes químicos semelhantes, sofrendo assim o mesmo grau de polarização cruzada, é

possível a comparação das áreas das mesmas regiões em diferentes espectros. Nos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , encontram-se os desvios químicos expressos em partes por milhão (ppm), sendo estes definidos relativamente às frequências de ressonância de um padrão (tetrametilsilano), através da equação:

$$\delta = \frac{(\nu_{\text{amostra}} - \nu_{\text{referência}})}{\nu_{\text{referência}}} \times 10^6 \quad (\text{IV-1})$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fizeram-se espectros de RMN CPMAS de  $^{13}\text{C}$  dos quatro solos sujeitos a diferentes tipos de fertilização: solo 6 (fertilização com lamas), solo 16 (fertilização com estrume), solo 7 (fertilização com composto) e solo 2 (fertilização mineral).

Todos os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos solos em estudo foram divididos em 7 zonas características:

- **Região 1:** 0 – 45 ppm, atribuída a carbonos do grupo alquilo [43];
- **Região 2a:** 45 – 60 ppm, atribuída aos grupos metoxilo da lenhina e polissacarídeos (hemicelulose) ou a carbonos ligados a azoto [46];
- **Região 2b:** 60 – 90 ppm, referente a carbonos ligados ao oxigénio por ligações simples [50], ou seja, a carbonos alquilo ligados ao oxigénio em álcoois, C2 ao C5 em hexoses (Fig.27) [46];
- **Região 2c:** 90 – 110 ppm, atribuída aos carbonos anoméricos ligados por ligações simples a dois átomos de oxigénio ou aos carbonos S2 e S6 nas unidades seringílicas (Fig.28) e G2 nas unidades guaiacílicas (Fig.29) (posição orto relativamente ao grupos funcional metoxilo) [50];
- **Região 3a:** 110 – 140 ppm, atribuída a carbonos aromáticos C-C e C-H [43, 46-48 e 50];
- **Região 3b:** 140 – 160 ppm, referente aos carbonos das ligações C-O e C-N aromáticos [46], atribuída às lenhinas [50];
- **Região 4a:** 160 – 190 ppm, atribuída a carbonos dos grupos carboxílicos, amidas e ésteres em lípidos e proteínas [46, 48, 50];



- **Região 4b:** 190 – 210 ppm, atribuída a carbonos do grupo carbonilo [46] com alguma sobreposição de quinonas (aldeídos ou cetonas) [50];

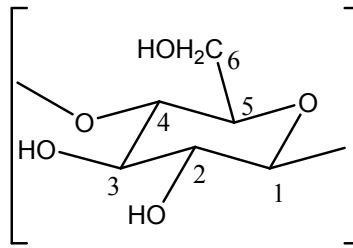


Figura 27 – Unidade estrutural da celulose

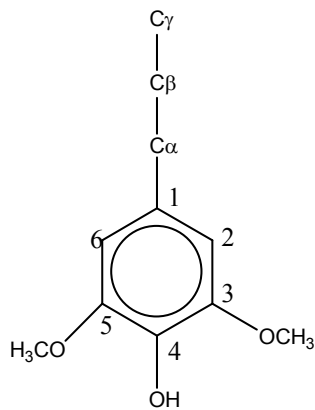


Figura 28 – Seringilo (S)

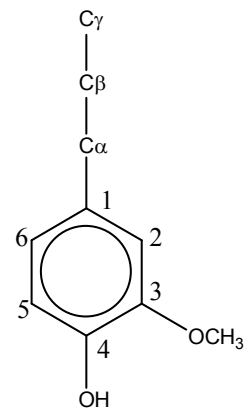


Figura 29 – Guaiacilo (G)

Todos os espectros obtidos, com as amostras de solo em estudo, encontram-se apresentados na Figura 30.

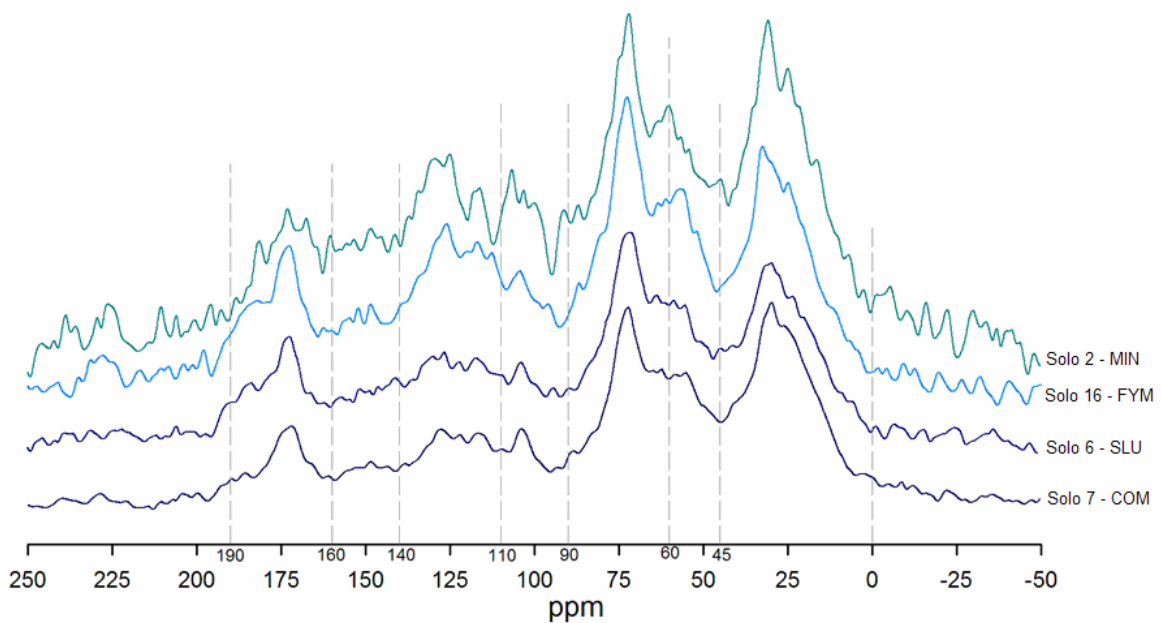


Figura 30 – Espectros de RMN CPMAS de  $^{13}\text{C}$  de diferentes solos: solo 6 (fertilizado com lamas), solo 16 (fertilizado com estrume), solo 7 (fertilizado com composto) e solo 2 (fertilização mineral)

Calcularam-se as áreas relativas, de cada intervalo definido anteriormente, para cada solo, e encontram-se representadas no gráfico da Figura 31.

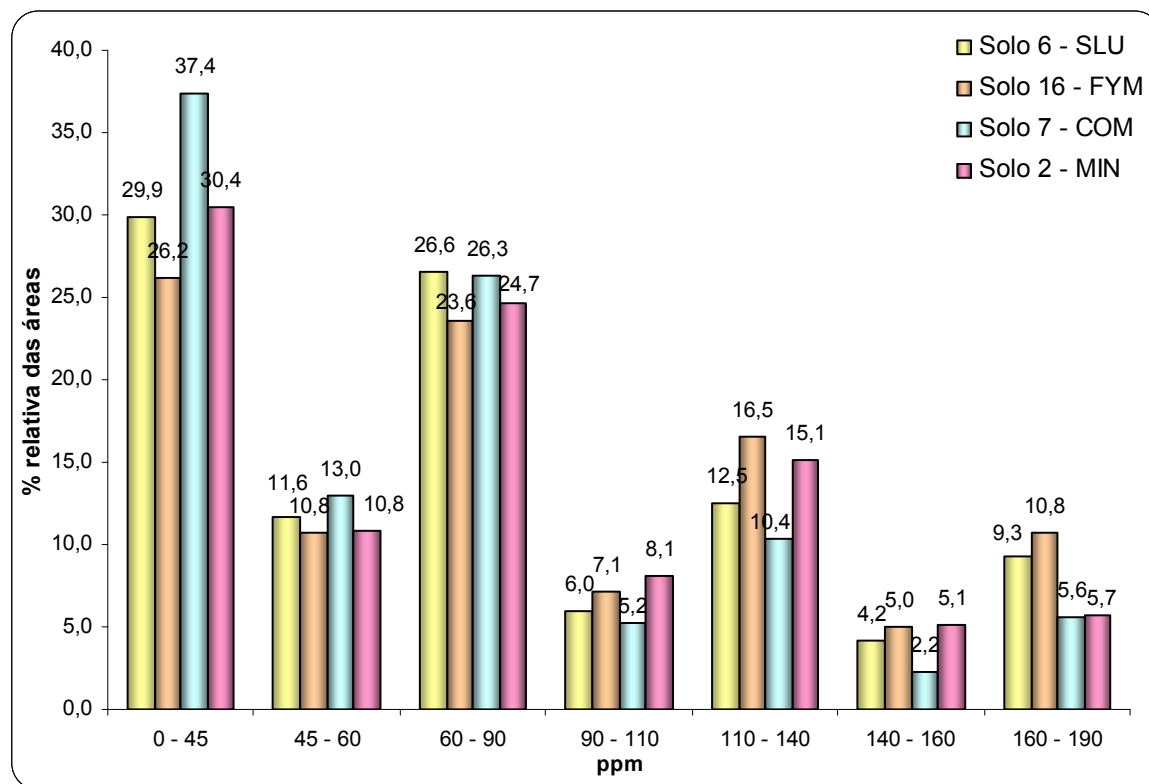


Figura 31 – Áreas relativas para cada solo analisado em cada um dos intervalos definidos anteriormente

#### 4.1. Intervalo: 0 – 45 ppm

Nesta zona, atribuída à ressonância de carbonos do grupo alquilo [43], observam-se dois picos, a 25 e a 31 ppm, nos solos 6 – SLU, 16 – FYM e 7 – COM, enquanto que no solo mineral, 2, já se consegue observar, para além desses dois picos, mais um pico a 16 ppm.

O solo mineral apresenta o pico a 16 ppm, característico de carbonos do grupo metilo ( $-\text{CH}_3$ ) [50]. Por outro lado, apresenta o pico a 25 ppm e a 31 bem resolvido. O solo 16 – FYM também apresenta um pico definido a 25 ppm, coisa que já não acontece nos solos 6 – SLU e 7 – COM. Esta zona entre 0 – 25 ppm encontra-se atribuída aos grupos metilo terminais.

Como se pode verificar na Figura 31, o solo fertilizado com composto (solo 7) é aquele que apresenta maior área relativa, atingindo os 37.4 %, sendo seguido pelo solo mineral (solo 2) com 30.4 %, pelo solo fertilizado com lamas (solo 6) e encontrando-se em último,

o solo fertilizado com estrume (solo 16) com 26.2 %. A maior área relativa do solo 7 – COM, com o principal pico localizado a 30 ppm, sugere uma maior presença de grupos metileno ( $-\text{CH}_2$ ) em cadeias longas de lípidos e proteínas [46] do que nos restantes solos.

#### 4.2. Intervalo: 45 – 60 ppm

Nesta zona, entre os 45 e 60 ppm, atribuída à ressonância de carbonos dos grupos metoxilo da lenhina e de polissacarídeos e a carbonos ligados a átomos de azoto [46], verifica-se, na Figura 31, que é, novamente, o solo 7 – COM que apresenta maior área relativa, cerca de 13 %. Esta maior área relativa no solo 7 – COM poderá dever-se aos carbonos ligados a átomos de azoto e poderá ser mais um indício da existência de maior quantidade de proteínas neste tipo de solo. Como se sabe as proteínas apresentam ligações peptídicas, ligações que ocorrem entre duas moléculas quando o grupo carboxílico de uma molécula reage com o grupo amina de outra, libertando uma molécula de água. Assim, os factos do solo 7 – COM apresentar maior área relativa de 0 – 45 ppm e de 45 – 60 ppm são dois fortes indícios da maior quantidade de proteínas neste tipo de solo.

Todos os solos apresentam picos a 56 e a 58 ppm, no entanto, é o solo 16 que apresenta o pico mais significativo a 56 ppm, geralmente atribuído a grupos metoxilo ( $-\text{OCH}_3$ ) ou etoxilo ( $-\text{OC}_2\text{H}_5$ ) de unidades estruturais seringilo e guaiacilo das lenhinas [50], sugerindo maior quantidade deste tipo de estruturas aromáticas neste solo.

#### 4.3. Intervalo: 60 – 90 ppm

A zona de desvio químico entre 60 e 90 ppm é, geralmente, devido à ressonância de carbonos alquilo ligados a oxigénios em álcoois e a carbonos C2 a C5 em hexoses [46]. Embora neste intervalo as diferenças nas áreas dos solos sejam pequenas, é possível, no entanto, verificar-se que os solos 6 – SLU e 7 – COM apresentam maiores valores de áreas relativas, cerca de 26 %, seguido do solo mineral, com cerca de 25 %, e do solo 16 – FYM, com cerca de 24%. Na zona de desvios químicos anterior, também os solos 6 – SLU e 7 – COM apresentavam maior área relativa. Esse intervalo para além de ser característico das proteínas, também pode ser atribuído à ressonância de carbonos em polissacarídeos. O

facto do solo 6 – SLU e 7 – COM apresentarem as maiores áreas relativas nestes dois intervalos, indica que serão solos com maior conteúdo de hidratos de carbono, relativamente aos outros dois solos. Um outro aspecto que nos sugere a presença dos hidratos de carbono é a presença de picos a 72 e a 104 ppm, valores de desvios químicos característicos destes compostos [45, 47]. Como se pode verificar na Figura 30, todos os solos apresentam picos a 72 e a 104, no entanto, são os solos 6 – SLU e 7 – COM, que apresentam picos mais bem definidos, sugerindo, mais uma vez, uma maior quantidade de hidratos de carbono neste tipo de solos.

#### **4.4. Intervalo: 90 – 110 ppm**

Esta zona de desvio químico encontra-se, geralmente, atribuída à ressonância de carbonos anoméricos, ligados por ligações simples a dois átomos de oxigénio [50] e aos carbonos na posição orto relativamente ao grupo funcional metoxilo (C2 e C6 nas unidades seringílicas e C2 nas unidades guaiacílicas) [50]. Nesta zona de desvios químicos, como podemos ver na Figura 31, as áreas diferem pouco. Em primeiro lugar temos o solo 2, mineral, com 8.1 %, depois aparece o solo 16, fertilizado com estrume, com 7.1%, seguido pelo solo 6 – SLU, com 6.0%, e pelo solo 7 – COM, com 5.2%. Nesta zona de desvio químico, verificamos a existência de um pico bem definido a 104 ppm, encontrando-se este pico mais bem definido nos solos 6 – SLU e 7 – COM. Como já foi dito anteriormente, este pico refere-se à ressonância de carbonos anoméricos dos hidratos de carbono e a apresentação de um pico bem definido, a este valor de desvio químico, sugere uma maior presença de hidratos de carbono nestes solos.

O facto do solo 16 – FYM apresentar uma área superior à do solo 6 – SLU e 7 – COM, provavelmente, será devido ao maior conteúdo em carbonos na posição orto relativamente ao grupo funcional metoxilo, devido ao maior conteúdo em lenhinas, uma vez que, como foi visto anteriormente, este solo aparenta ter um maior conteúdo em estruturas seringilo e guaiacilo das lenhinas.

#### 4.5. Intervalo: 110 – 140 ppm

Entre 110 – 140 ppm encontram-se as ressonâncias características de carbonos aromáticos C–C e C–H [43, 46 - 48, 50].

Na Figura 31, verifica-se que o solo 16 – FYM apresenta uma maior área relativa, com 16.5 %, seguido do solo mineral, com 15.1 %, do solo 6 – SLU, com 12.5 % e, por último, do solo 7 – COM, com 10.4 %. Uma vez que o solo 16 – FYM, fertilizado com estrume, apresenta uma maior área relativa, podemos considerá-lo como o solo com maior conteúdo aromático. No intervalo de 110 a 140 ppm é possível verificar a existência de alguns picos. O solo 16 – FYM apresenta apenas 3 picos, mais bem definidos, a 113, 116 e 126 ppm, sendo, este último, mais intenso que os anteriores e, geralmente, atribuído a carbonos aromáticos protonados e substituídos, bem como a carbonos insaturados [46]. O pico a 116, geralmente atribuído a carbonos aromáticos protonados em posição orto relativamente ao grupo fenólico (G5), indicando a presença de grupos guaiacilo [50], aparece com uma maior definição no solo 16 – FYM. Mais uma vez surge a indicação de que este solo, fertilizado com estrume, apresenta um conteúdo fenólico superior aos restantes.

#### 4.6. Intervalo: 140 – 160 ppm

No intervalo de desvio químico entre 140 e 160 ppm encontram-se, geralmente, sinais atribuídos à ressonância de carbonos do grupo C–O e C–N aromáticos [46] e de carbonos de lenhinas [50].

Neste intervalo, como é possível verificar, os solos 16 – FYM e 2 – MIN são os que apresentam maior área relativa, cerca de 5 % cada, seguidos pelo solo 6 – SLU com 4.2 % e pelo solo 7 – COM, com apenas 2.2 %.

O solo 16 – FYM apresenta 3 picos bem definidos a 148, 152 e 155 ppm. Os picos a 148 e a 126 ppm sugerem, novamente, uma maior presença de conteúdo lenhoso neste solo [47]. Para além disso, a presença de um pico bem definido a 152 ppm, característico de carbonos ligados a fenóis [48] e de carbonos aromáticos com grupo metoxilo [50], também sugere a existência de um maior conteúdo fenólico no solo fertilizado com estrumes animais.

Apesar do solo 2 – MIN apresentar uma área semelhante à do solo 16, apresenta uma quantidade de picos muito superior, originando a suspeita de existência de algum ruído espectral que possa adulterar a interpretação dos resultados.

#### **4.7. Intervalo: 160 – 190 ppm**

Esta zona de desvio químico do espectro de RMN é, geralmente, atribuída a carbonos de grupos carboxílicos, amidas e ésteres [46, 48, 50].

O solo 16 – FYM apresenta uma área (10.8 %) superior aos restantes solos, seguido do solo 6 – SLU, com 9.3 %. Os solos 2 – MIN e 7 – COM são os que apresentam menor área relativa, apresentando, respectivamente, uma área de 5.7 % e 5.6 %.

Uma observação atenta dos espectros de RMN, apresentados na Figura 30, permitem verificar, nos solos 6 – SLU, 7 – COM e 16 – FYM, a existência de apenas um pico, bem definido, a 173 ppm, característico dos grupos carboxílicos e de amidas. O solo mineral já apresenta diversos picos nesta zona do espectro, podendo dever-se à existência de ruído. No que diz respeito ao pico a 173 ppm, no solo 2 – MIN não se encontra a presença de um pico bem definido, como acontecia nos restantes solos.

#### **4.8. Outras considerações**

A contínua degradação dos resíduos das plantas encontra-se associada à diminuição da contribuição relativa dos carbonos alquilo ligados ao oxigénio e ao aumento da contribuição relativa dos carbonos do grupo alquilo, originando um aumento da razão entre a área 0 – 45 ppm e a área 45 – 110 ppm [46]. Na Figura 32, encontram-se representadas as razões calculadas para cada solo em estudo.

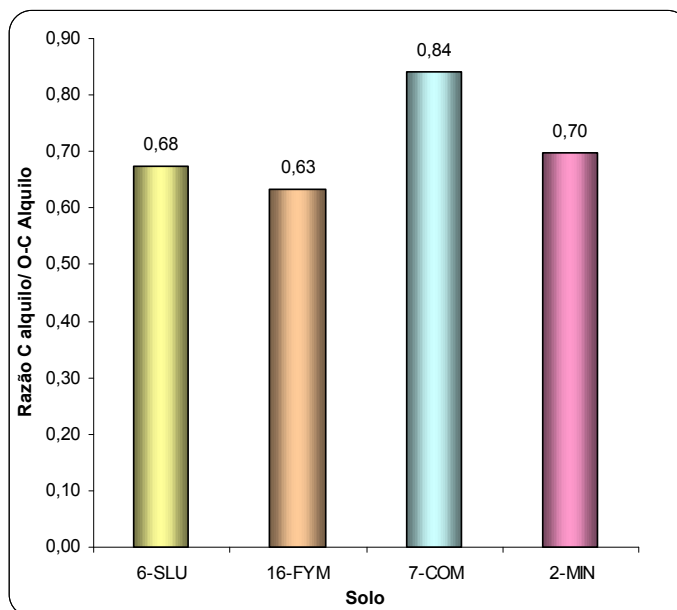


Figura 32 – Razão C Alquilo/ O – C alquilo para cada solo

Como é possível verificar pelo gráfico apresentado, o solo 7 – COM apresenta uma maior razão (0.84), sugerindo, por esse motivo, ser o solo com maior grau de degradação da matéria orgânica. Imediatamente a seguir encontramos o solo mineral, com 0.70, e o solo fertilizado com lamas, com 0.68. O solo 16 – FYM é aquele que apresenta uma menor razão (0.63) entre a área referente à ressonância dos carbonos do grupo alquilo e a área dos carbonos alquilo ligadas ao oxigênio. A menor razão deste solo é devida à menor percentagem de carbonos alquilo e maior contribuição dos grupos alquilo ligado ao oxigênio. Assim, este solo fertilizado com estrumes animais aparenta ser o solo com matéria orgânica menos degradada. O elevado conteúdo orgânico, sugerido pelos dados do espectro de RMN CPMAS de  $^{13}\text{C}$ , pode ser a causa da existência de uma matéria orgânica menos degradada, uma vez que as estruturas aromáticas são, normalmente, estruturas mais resistentes à degradação.

## 5. CONCLUSÕES

A comparação dos espectros de RMN CPMAS de  $^{13}\text{C}$  permitem-nos tirar algumas conclusões relativas à estrutura da matéria orgânica, existentes em cada solo, sujeito a diferentes fertilizações:

- O solo 7 – COM apresenta maior área relativa no intervalo de desvio químico de 0 a 45 ppm, com o principal pico localizado a 30 ppm, sugerindo uma maior presença de grupos metileno ( $-\text{CH}_2$ ), em cadeias longas de lípidos e proteínas, do que nos restantes solos;
- O solo 7 – COM apresenta maior área relativa no intervalo de desvio químico de 45 a 60 ppm. Esta maior área relativa, no solo 7 – COM, poderá dever-se aos carbonos ligados a átomos de azoto e poderá ser mais um indício da existência de maior quantidade de proteínas neste tipo de solo. Assim, os factos do solo 7 – COM apresentar maiores áreas relativas de 0 – 45 ppm e de 45 – 60 ppm são dois fortes indícios da maior quantidade de proteínas neste tipo de solo;
- O solo 16 – FYM apresenta o pico mais significativo a 56 ppm, atribuído a grupos metoxilo ( $-\text{OCH}_3$ ) ou etoxilo ( $-\text{OC}_2\text{H}_5$ ) de unidades estruturais seringilo e guaiaçilo das lenhinas, sugerindo maior quantidade deste tipo de estruturas neste solo;
- Os solos 6 – SLU e 7 – COM apresentam maiores valores de área no intervalo de desvio químico entre 60 e 90 ppm, bem como no intervalo entre 45 e 60 ppm. O facto de apresentarem maiores áreas relativas nestes dois intervalos indica que deverão ser solos com maior conteúdo de hidratos de carbono relativamente aos outros dois solos. Para além disso, os picos bem definidos a 72 e 104 ppm nestes solos sugerem, uma vez mais, uma maior quantidade de hidratos de carbono nestes solos;
- O solo 16 – FYM apresenta uma área superior, no intervalo de 90 a 110 ppm, do que o solo 6 – SLU e 7 – COM, provavelmente devido ao maior conteúdo em carbonos na posição orto relativamente ao grupo funcional metoxilo, ou seja devido ao maior conteúdo de lenhinas existente neste solo.
- O solo 16 – FYM apresenta também uma maior área relativa entre 110 e 140 ppm sugerindo novamente maior conteúdo aromático. O pico a 116 aparece



mais bem definido neste solo e é, geralmente, atribuído a carbonos aromáticos protonados em posição orto relativamente ao grupo fenólico (G5), indicando uma maior presença de grupos guaiacilo.

- Os solos 16 – FYM e 2 – MIN são os que apresentam maior área relativa entre 140 e 160 ppm. O solo 16 – FYM apresenta 3 picos bem definidos a 148, 152 e 155 ppm. Os picos a 148 e a 126 ppm sugerem, novamente, maior presença de conteúdo lenhoso neste solo. Para além disso, a presença de um pico bem definido a 152 ppm, característico de carbonos ligados a fenóis e de carbonos aromáticos com grupo metoxilo, também sugere a existência de um maior conteúdo fenólico no solo fertilizado com estrumes animais.
- O solo 16 – FYM também apresenta maior área relativa entre 160 e 190 ppm sugerindo uma maior quantidade de grupos carboxílicos, amidas e ésteres. O pico bem definido a 173 ppm, nos solos 6 – SLU, 7 – COM e 16 – FYM é característico dos grupos carboxílicos e de amidas.
- O solo 7 – COM apresenta maior razão entre a área 0 – 45 ppm e a área 45 – 110 ppm, indicando a existência de um maior grau de degradação da matéria orgânica. Por outro lado, o solo fertilizado com estrumes animais aparenta ser o solo com matéria orgânica menos degradada, facto que poderá ser explicado devido ao seu maior conteúdo aromático (estruturas mais resistentes à degradação).

A comparação dos diversos espectros RMN CPMAS de  $^{13}\text{C}$  permite-nos verificar a existência de diferenças a nível estrutural entre a matéria orgânica dos solos, que podem ser atribuídas às diferentes fertilizações a que os solos foram sujeitos.





# Espectroscopia de Infravermelho



## 1. OBJECTIVOS

Este trabalho tem como objectivo a utilização da espectroscopia de infravermelho na caracterização dos grupos estruturais, presentes nos solos sujeitos a diferentes tipos de fertilização.

## 2. INTRODUÇÃO

A espectroscopia de infravermelho aliada à ressonância magnética nuclear, como técnicas não destrutivas, permite a realização de uma análise, a nível estrutural, da matéria orgânica presente no solo, sendo orientada no sentido de caracterizar a natureza e distribuição dos grupos funcionais presentes nos solos.

A espectroscopia de infravermelho é uma espectroscopia de absorção, a qual usa a região do infravermelho do espectro electromagnético. Tal como outras técnicas espectroscópicas, esta pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra, sendo possível obter informações sobre a natureza, a reactividade e o tipo de grupos funcionais presentes na estrutura, a existência de constituintes derivados de proteínas e hidratos de carbono, e ainda as proporções relativas de porções aromáticas ou alifáticas.

Esta técnica baseia-se no facto das ligações químicas das substâncias possuírem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula – níveis vibracionais. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria da molécula, da massa dos átomos e, eventualmente, do acoplamento vibracional.

A fim de se fazerem medidas numa amostra, um raio monocromático de luz infravermelha é feito passar através da amostra e a quantidade de energia absorvida é registada. Repetindo-se esta operação, ao longo de uma gama de número de onda de interesse, normalmente 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , um gráfico pode ser construído.

As amostras sólidas são, geralmente, preparadas misturando-se uma certa quantidade de amostra com um sal altamente purificado, como, por exemplo, Brometo de potássio (KBr). Esta mistura é triturada e prensada de forma a obtermos uma pastilha, através da

qual a luz pode passar. Essa pastilha precisa ser prensada a altas pressões a fim de garantir que seja translúcida. O brometo de potássio não absorve a radiação infravermelha, sendo as linhas espectrais presentes unicamente as referentes ao analito.

A espectroscopia de infravermelho, usando as transformadas de Fourier (FTIR), é uma técnica de análise que permite obter o espectro de infravermelho mais rapidamente. Em vez de se recolherem os dados variando-se a frequência da luz infravermelha, a luz é guiada através de um interferómetro. Depois de passar pela amostra, o sinal medido em função do tempo, interferograma, é convertido num sinal em função da frequência, utilizando-se as transformadas de Fourier.

Estes espectrofotómetros são mais baratos devido à sua simplicidade. A informação é obtida muito mais rapidamente porque as informações de todas as frequências são obtidas simultaneamente. Assim, podemos efectuar várias medições da mesma amostra e obter um espectro médio, aumentando a sensibilidade da análise.

A interpretação dos espectros de infravermelho, de algumas amostras, é significativamente limitada, devida à pobre resolução resultante do alargamento e sobreposição das bandas. Assim, a comparação entre espectros dará somente uma indicação sobre se o conteúdo em grupos funcionais de cada uma das amostras é ou não semelhante.

### **3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

#### **3.1. Tratamento da Amostra**

Antes da análise espectroscópica de infravermelho, as amostras de solo foram sujeitas a um tratamento sucessivo, com uma solução de ácido fluorídrico a 2 %. Cada tratamento envolve uma agitação de porções de 5 g de solo em 40 mL de solução de ácido fluorídrico 2 %, por períodos de 1 hora (5 vezes), seguidos de períodos de 16 h (3 vezes) e, por fim, um período de 64 h. Entre cada tratamento, as amostras foram centrifugadas, durante 10 min a 4000 rpm, o sobrenadante foi removido, sendo substituído por nova solução de HF. No final do tratamento, o resíduo foi lavado 2 vezes com água destilada e depois liofilizado [43].

#### **3.2. Instrumentação**

O espectro de infravermelho das diversas amostras de solo foi obtido utilizando um espectrofotômetro Nicolet – Magna 550, com transformadas de Fourier. Acumularam-se 128 interferogramas, no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As pastilhas de KBr foram feitas com 80 mg de KBr e 0,8 mg de amostra de solo.

### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste trabalho, realizaram-se espectros de infravermelho de 4 amostras de solos, sujeitos a diferentes fertilizações. A interpretação dos espectros da matéria orgânica dos solos é, geralmente, orientada no sentido de caracterizar a natureza e distribuição dos grupos funcionais presentes. No entanto, a completa interpretação dos dados obtidos nesses espectros é significativamente limitado, devido à pobre resolução resultante do alargamento e sobreposição das bandas. Uma vez que, neste caso, se utilizam solos com, no máximo, 10 % de matéria orgânica, o problema ainda se torna maior, no que diz respeito à intensidade das bandas e resolução. Uma vez que estes solos apresentavam um

elevado conteúdo mineral foi efectuado o tratamento com Ácido Fluorídrico a 2 %. Segundo Rumpel et al. (2006) o tratamento com HF origina uma quebra nas ligações Si–O, e consequente solubilização dos minerais [54]. Com este tratamento consegue-se melhorar os espectros dos solos, havendo uma diminuição da banda a  $1040\text{ cm}^{-1}$ , característica das vibrações de elongação Si–O. Assim, se pretendermos analisar as contribuições dos hidratos de carbono nas amostras em estudo, através da banda a  $1040\text{ cm}^{-1}$ , torna-se importante remover a matéria mineral, argilas e quartzo, de modo a não ocorrer a sobreposição destas bandas.

Neste trabalho, compararam-se os espectros de infravermelho das quatro amostras de solo, sujeitos a diferentes fertilizações. A Figura 33 mostra os espectros de infravermelho das diferentes amostras em estudo.

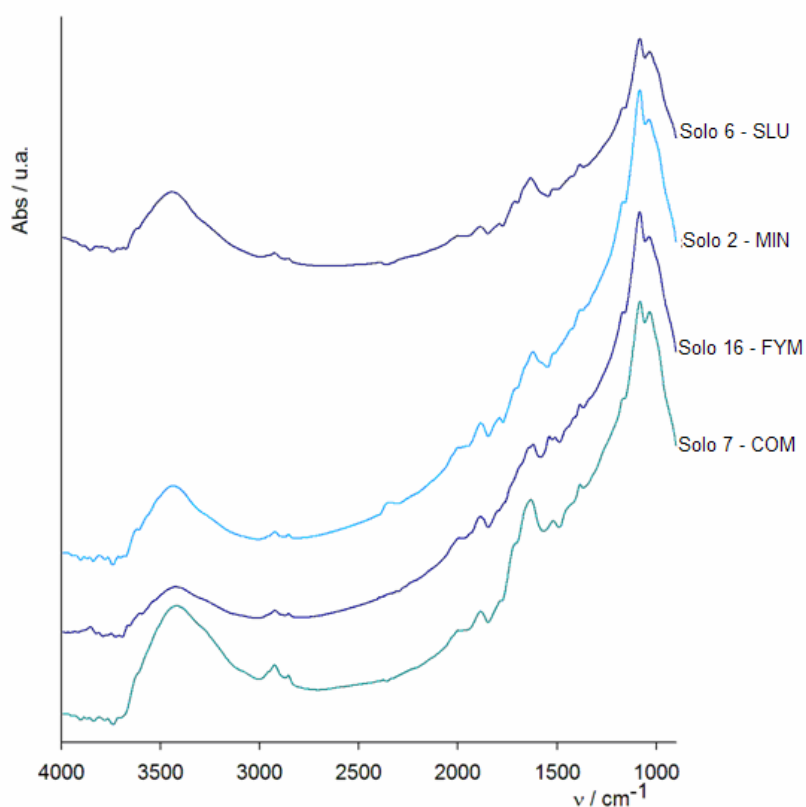


Figura 33 – Espectros de Infravermelho das diferentes amostras de solo

As atribuições das bandas de absorção devem ser vistas como valores aproximados, uma vez que diferentes autores referem frequências ligeiramente diferentes para as mesmas bandas.



#### 4.1. Zona 3600-2500 $\text{cm}^{-1}$

Os espectros de infravermelho apresentam uma banda larga, cuja intensidade máxima se situa entre os 3200 e 3400  $\text{cm}^{-1}$ . Esta banda tem sido atribuída a vibrações de elongação O-H de grupos hidroxilo em fenóis, álcoois ou ácidos carboxílicos, podendo também ser atribuída às vibrações de elongação N-H [50, 51, 53-57]. O envolvimento dos grupos O-H, em ligações de hidrogénio, provoca um deslocamento destas bandas para frequências menores. Nos ácidos carboxílicos, as ligações de hidrogénios são, geralmente, muito fortes, logo a frequência de elongação OH desloca-se para frequências ainda menores, dando origem a uma banda larga e fraca, acompanhada de um série de bandas de menor intensidade, na zona de 2500 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  [55]. Caso não existam ligações de hidrogénio, poderemos encontrar esta banda entre os 3500 e os 3700  $\text{cm}^{-1}$ , sendo os valores mais altos observados em álcoois alifáticos e os mais baixos em ácidos carboxílicos [55].

Nesta zona, também aparecem, sobreposta à banda larga de elongação O-H, bandas mais estreitas, próximas dos 2900  $\text{cm}^{-1}$  que têm sido atribuídas às vibrações de elongação C-H das unidades metileno e metilo de cadeias alifáticas [48, 50-57]. A presença de picos definidos e intensos indica um elevado grau de alificidade, ou seja, indica a presença de matéria orgânica com menor maturação [52]. De um modo geral, bandas devidas às vibrações assimétricas e simétricas dos grupos C-H, de unidades metilo ( $-\text{CH}_3$ ) de cadeias alifáticas, dão origem a bandas situadas a  $2960 \pm 10$  e  $2872 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, enquanto que bandas devidas às vibrações assimétricas e simétricas dos grupos C-H, de unidades metileno ( $-\text{CH}_2$ ) de cadeias alifáticas, dão origem a bandas situadas a  $2926 \pm 10$  e  $2853 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente [50].

A observação dos espectros, na região dos 3050 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 34), permite constatar a existência de duas bandas, menos intensas, a 2962 e 2873  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas, respectivamente, às vibrações assimétricas e simétricas dos grupos C-H, de unidades metilo ( $-\text{CH}_3$ ) de cadeias alifáticas e outras duas, mais intensas, a 2920 e a 2853  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações assimétricas e simétricas dos grupos C-H, de unidades metileno ( $-\text{CH}_2$ ) de cadeias alifáticas, respectivamente.

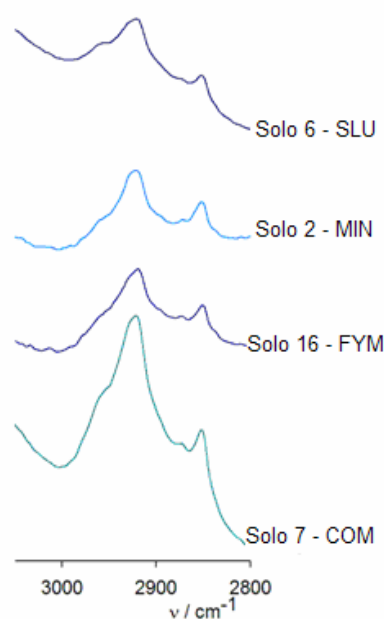


Figura 34 – Espectros de Infravermelho da região de 3050 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  das diferentes amostras de solo

A maior intensidade relativa das bandas a 2920 e 2853  $\text{cm}^{-1}$ , nos espectros dos solos 7 – COM, 16 – FYM e 2 – MIN, em relação às bandas 2962 e 2873  $\text{cm}^{-1}$ , sugere uma maior proporção de grupos metileno em relação aos grupos metilo. No caso do solo 6 – SLU, verifica-se que a proporção de grupos metileno, em relação ao grupo metilo, não será tão acentuada, uma vez que no espectro desta amostra se verifica que as bandas a 2962 e 2873  $\text{cm}^{-1}$  apresentam uma intensidade ligeiramente superior à dos restantes solos e as bandas a 2920 e 2853  $\text{cm}^{-1}$  uma intensidade inferior. O solo 7 – COM apresenta bandas, nesta região, com maior intensidade que os restantes solos, indicando um maior conteúdo em grupos  $\text{CH}_2$ . Estes dados encontram-se de acordo com os dados do RMN de  $^{13}\text{C}$  que também indicavam este solo como o mais rico em grupos metileno, bem como o mais rico em carbonos do grupo alquilo.

#### 4.2. Zona 1900-900 $\text{cm}^{-1}$

Neste zona do espectro, entre 1900 e 900  $\text{cm}^{-1}$ , encontramos 3 bandas, uma das quais com a intensidade máxima a 1080  $\text{cm}^{-1}$ . Esta banda a 1080  $\text{cm}^{-1}$  tem sido atribuída à vibração de elongação C-O de polissacarídeos [48, 50] e apresenta um ombro a 1040  $\text{cm}^{-1}$ , referido como característico de ésteres aromáticos e de vibrações de elongação de C-H em polissacarídeos, bem como de ligações Si-O-Si em silicatos [54]. A existência de um pico a 1170  $\text{cm}^{-1}$ , por seu lado, sugere a presença de grupos álcool devido às vibrações de elongação dos grupos C-O [53].

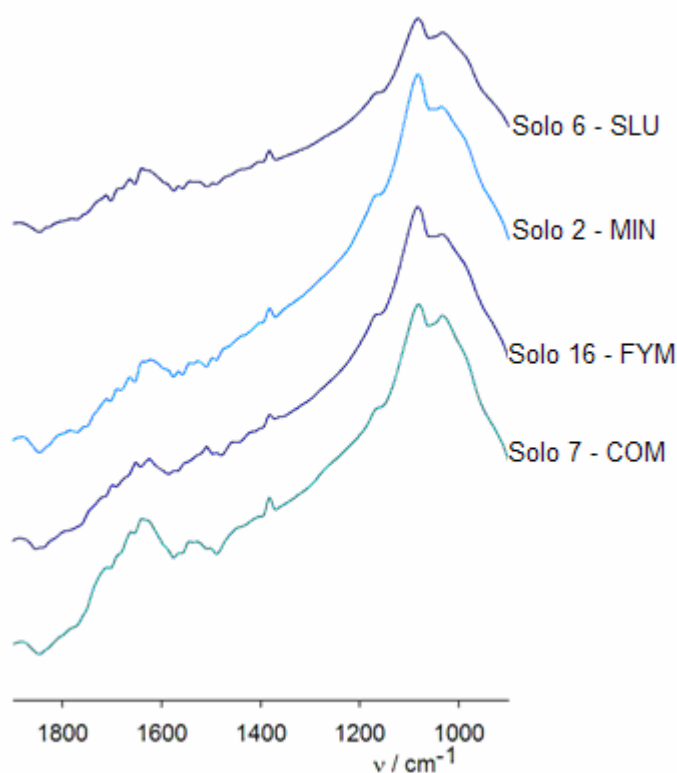


Figura 35 – Espectros de Infravermelho da região de 1900 a 900  $\text{cm}^{-1}$  das diferentes amostras de solo

No caso das amostras em questão, verificamos que a amostra de solo 7, fertilizado com composto (Figura 35), apresenta a 1040  $\text{cm}^{-1}$  um pico mais bem definido em relação aos outros solos. Este pico poderá dever-se quer à presença de polissacarídeos, quer à presença de silicatos. No entanto, todos estes solos foram tratados com ácido fluorídrico a 2 %, sendo de esperar uma diminuição da interferência das vibrações de elongação das ligações Si-O-Si, sendo possível atribuir a diferença de sinal entre os solos à presença dos hidratos

de carbono. Assim, tal como já foi verificado no RMN de  $^{13}\text{C}$ , o solo 7 – COM deverá apresentar um conteúdo em hidratos de carbono superior aos restantes solos. Relativamente às restantes bandas existentes nesta zona, não são possíveis observar diferenças significativas entre as amostras de solo.

Na zona a números de onda maiores, encontramos duas pequenas bandas, uma com o seu máximo de intensidade a  $1540\text{ cm}^{-1}$  e outra entre  $1600$  e  $1660\text{ cm}^{-1}$ .

A banda existente a  $1540\text{ cm}^{-1}$  tem sido, habitualmente, atribuída à vibração de alongação da ligação C-N de grupos amida [53, 57], bem como a vibrações de deformação N-H de amidas [50, 52, 53]. Por outro lado, também poderá ser atribuída às vibrações de alongação de ligações C=C aromáticas [50, 56], e de carboxilatos [50]. A banda que aparece entre  $1600$  e  $1660\text{ cm}^{-1}$ , mais propriamente a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , poderá ser atribuída a vibrações de alongação C=O de grupos amida, devido à incorporação de proteínas [53]. Há também quem atribua esta zona a vibrações de alongação C=C aromáticas, C=O em amidas primárias, cetonas e quinonas [50, 54-57].

Como se pode ver na Figura 35, a banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$  é mais intensa no espectro referente à amostra do solo 7 – COM. Esta banda pode ser atribuída a diferentes vibrações, no entanto, e tendo em conta os resultados do RMN de  $^{13}\text{C}$ , provavelmente será devida à vibração de alongação C-N e de deformação N-H de grupos amida. Esta ideia é consolidada pelo aparecimento, neste solo, de uma banda mais intensa a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações de alongação C=O de grupos amida, devido à incorporação de proteínas.

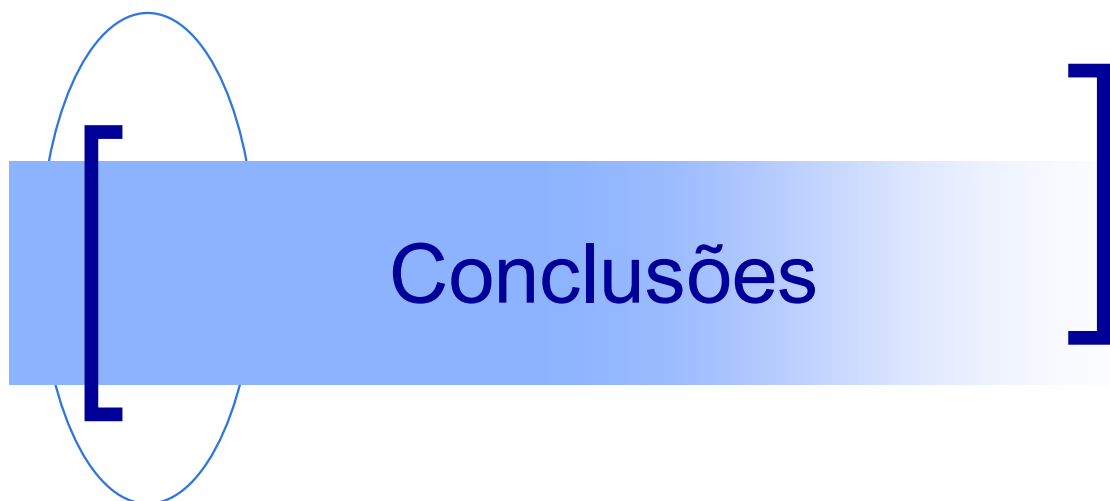
A existência de um ombro a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , mais visível no solo 7 – COM, indica-nos a existência de vibrações de alongação C=O, essencialmente devidas a grupos carboxílicos, mas também a grupos carbonilo em cetonas e aldeídos [53].

## 5. CONCLUSÕES

A comparação dos espectros de FTIR, obtidos para cada amostra de solo, juntamente com os resultados dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , permite-nos chegar a algumas conclusões:

- Os solos 7 – COM, 16 – FYM e 2 – MIN aparentam ter uma maior proporção de grupos metileno em relação aos grupos metilo, devido à maior intensidade das bandas a  $2920$  e  $2853\text{ cm}^{-1}$  em relação às bandas  $2962$  e  $2873\text{ cm}^{-1}$ , do que o solo 6 – SLU.
- O solo 7 – COM apresenta bandas na região de vibração de elongação C-H alquilo com maior intensidade que os restantes solos, indicando um maior conteúdo em grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . Estas conclusões encontram-se de acordo com as obtidas através da espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$ , que indicavam este solo como o mais rico em carbonos do grupo alquilo, bem como em grupos metileno;
- A amostra de solo 7 – COM, considerada pela análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  como das amostras mais ricas em hidratos de carbono, apresenta também na análise por FTIR um pico a  $1040\text{ cm}^{-1}$  mais bem definido em relação aos restantes solos, confirmando a hipótese anteriormente sugerida;
- A amostra de solo 7 – COM também apresenta bandas mais intensas a  $1540\text{ cm}^{-1}$  e a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , a primeira, provavelmente, devida à vibração de elongação C-N e de deformação N-H de grupos amida e a segunda, geralmente, atribuída a vibrações de elongação C=O de grupos amida. Estas duas bandas mais intensas sugerem um maior conteúdo em proteínas, resultado esse que se encontra concordante com os obtidos pelo RMN de  $^{13}\text{C}$ ;









Este trabalho teve como objectivo caracterizar as diferentes amostras de solo sujeitas a diferentes tipos de fertilização.

Ao determinar-se a percentagem de matéria orgânica presente em cada solo verificaram-se diferenças entre cada um deles. Nomeadamente, o solo fertilizado com composto apresentava um conteúdo em matéria orgânica muito superior aos restantes solos, atingindo quase os 10 %. O solo mineral foi aquele que, em média, apresentou um valor mais baixo (5.3 %), não sendo muito diferente do valor obtido para o solo fertilizado com estrume (5.5 %). O solo fertilizado com lamas apresenta um valor ligeiramente superior aos anteriores, cerca de 6.2 %. Os resultados do conteúdo em cinzas obtidos para cada solo, usando a termogravimetria, foram concordantes com os obtidos por combustão a 550 °C.

No que diz respeito à determinação dos compostos fenólicos, derivados da degradação com óxido de cobre da matéria orgânica do solo, os resultados permitiram concluir que todos os solos, excepto o fertilizado com estrume, apresentavam maiores teores de vanilina, relativamente aos outros compostos. No que diz respeito ao solo fertilizado com estrume, verificou-se que a acetoseringona se encontrava presente em maior quantidade. Também neste solo, verificou-se que a quantidade total de fenóis determinada é superior, apresentando uma quantidade de fenóis da família seringilo superior à dos restantes solos e, consequentemente, superior razão S/V. Estas observações indicam-nos que o estrume incorporado no solo, durante a fertilização, aumenta a quantidade de fenóis derivados da lenhina, em particular fenóis característicos de plantas angiospérmicas. Assim, o facto de serem utilizadas palhas na preparação deste tipo de fertilizante poderá explicar o aumento do conteúdo fenólico derivado da lenhina, principalmente do grupo seringilo. Compostos do grupo cinamilo característicos de plantas herbáceas, encontram-se presentes (não em todos os solos), mas sempre em pequenas quantidades. Para além disso, as razões C/V baixas indicam-nos que a contribuição de plantas herbáceas é muito reduzida. Quanto à baixa concentração em ácidos, indica-nos a presença de uma matéria orgânica pouco degradada, uma vez que com a oxidação das cadeias laterais ocorre a transformação de grupos aldeído/cetona em grupos ácido. O facto de ser pouco degradada sugere uma contribuição de matéria orgânica proveniente das próprias plantações existentes nos solos e não apenas da fertilização em causa. Utilizando a análise de componentes principais foi possível verificar que as amostras analisadas podem formar 4 grupos. Estes grupos estão de

acordo com o tipo de fertilização, encontrando-se dois grupos distintos (referentes às fertilizações com composto e estrume) no plano xOy e outros dois separados no plano xOz (fertilização mineral e com lamas).

No que diz respeito aos resultados obtidos na degradação térmica das amostras, verificamos que os solos fertilizados com composto apresentavam maior perda de massa à temperatura característica da: decomposição térmica de hidratos de carbono, perda de saturação e decomposição de grupos carboxílicos, metilo e metileno. Estes dados sugerem que o solo fertilizado com composto apresenta um maior conteúdo relativo deste tipo de estruturas que os restantes solos. Para além disso, a elevada perda de massa dos solos minerais e dos solos fertilizados com estrume a baixas temperaturas, sugere um maior conteúdo relativo em grupos funcionais que os restantes solos. Por último, os solos fertilizados com lamas apresentam grandes perdas a temperaturas mais elevadas, sugerindo um maior conteúdo relativo em estruturas aromáticas e polinsaturadas.

A caracterização estrutural da matéria orgânica dos diferentes solos foi efectuada com base na espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  e na espectroscopia de infravermelho.

A existência de uma maior área relativa, no intervalo de desvio químico de 0 a 45 ppm, do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do solo fertilizado com composto, sugere um maior conteúdo em grupos metileno ( $-\text{CH}_2$ ) em cadeias longas de lípidos e proteínas. A presença de bandas na região de vibração de elongação C-H alquilo, nos espectros de infravermelho deste mesmo solo, sugere também um maior conteúdo em grupos metileno e metilo. O facto do solo fertilizado com composto apresentar uma das maiores áreas relativas, no intervalo de desvio químico de 60 a 90 ppm, do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , e de apresentar um pico mais bem definido a  $1040\text{ cm}^{-1}$ , no espectro de infravermelho, indicam um maior conteúdo em hidratos de carbono, relativamente aos restantes solos. Estes resultados encontram-se de acordos com a ideia dada pela degradação térmica das amostras, que também sugere a existência de um maior conteúdo em hidratos de carbono e grupos metilo e metileno, neste tipo de solo. A fertilização com composto também parece originar um aumento do conteúdo proteico nos solos, uma vez que os dados do RMN de  $^{13}\text{C}$  confirmam a existência de uma maior área relativa entre 45 – 60 ppm, característica de carbonos ligados a átomos de azoto. Também os dados obtidos pelo FTIR, sugerem um maior conteúdo em proteínas, devido à presença de uma banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações de elongação C-N e

deformação N–H e outra a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações de elongação C=O de grupos amida, mais intensas que os restantes solos.

O solo fertilizado com lamas apresentou resultados que também sugerem um elevado conteúdo em hidratos de carbono, como os maiores valores de áreas relativas, no intervalo de desvio químico entre 60 e 90 ppm, e a existência de dois picos bem definidos a 72 e 104 ppm, nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

A ideia que o solo fertilizado com estrume apresentava maior quantidade de compostos fenólicos, comparativamente aos restantes solos, baseada nos resultados da sua determinação, é também acompanhada pelos resultados obtidos com a espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$ . O facto deste solo apresentar um pico mais definido a 56 ppm (atribuído aos grupos metoxilo ou etoxilo de unidades seringilo e guacilo das lenhinas), uma maior área relativa entre 90 e 110 ppm (atribuída aos carbonos na posição orto relativamente ao grupo funcional metoxilo das unidades características da lenhina), uma maior área relativa entre 110 e 140 ppm (atribuídas aos carbonos em unidades da lenhina), um pico mais bem definido a 116 ppm (atribuído a carbonos aromáticos protonados em posição orto relativamente ao grupo fenólico, indicando a presença de grupos guaiacilo) e a 152 ppm (característico de carbonos ligados a fenóis e carbonos aromáticos com grupo metoxilo) são tudo indícios da existência de um maior conteúdo em fenóis derivados da lenhina.

Os dados obtidos durante todo este estudo permitiram-nos chegar à conclusão que existem diferenças a nível estrutural nos solos, quando estes são sujeitos a diferentes tipos de fertilização.







- [1] – Site: [www.wikipedia.org/wiki/Fertilizante](http://www.wikipedia.org/wiki/Fertilizante)
- [2] – Cunha, M.J., Amaro, R., Oliveira, A., Casau, F.. “Tecnologias Limpas em Agro-Pecuária”, Sociedade Portuguesa de Inovação, 1ª Edição, 2005.
- [3] – Site: [http://www.isa.utl.pt/dqaa/soloeambiente/PSA\\_Resumo.pdf](http://www.isa.utl.pt/dqaa/soloeambiente/PSA_Resumo.pdf)
- [4] – Site: <http://www.apda.pt>
- [5] – Adani, F., Tambone, F.. 2005. Long-term effect of sewage sludge application on soil humic acids. *Chemosphere*. 60: 1214-1221.
- [6] – Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F.. 2001. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource Technology*, 77: 109-114.
- [7] – Hedges, J.I., Ertel, J.R.. 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Anal. Chem.*, 54: 174-178.
- [8] – Tareq, S. M., Tanaka, N., Keiichi, O.. 2004. Biomarker signature in tropical wetland: lignin phenol vegetation index (LPVI) and its implications for reconstructing the paleoenvironment; *Science of the Total Environment*, 324: 91-103.
- [9] – Javor, T., Buchberger, W., Tanzos, I.. 2000. Determination of low-molecular-mass phenolic and non-phenolic lignin degradation compounds in wood digestion solutions by capillary electrophoresis. *Mikrochimica Acta*, 135: 45-53.
- [10] – Miltner, A., Zech, W.. 1998. Beech litter lignin degradation and transformation as influenced by mineral phases. *Org. Geochem*, 28: 457-463.

- [11] – Dittmar T., Lara J.R.. 2001. Molecular evidence for lignin degradation in sulphate-reduction mangrove sediments (Amazônia,Brazil). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65: 1417-1428.
- [12] – Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K.. 2000. Characterization of lake-aquatic humic matter isolated with two different sorbing solid techniques: tetramethylammonium hydroxide treatment and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 424: 91-103.
- [13] – Hautala, K., Peuravuori, J., Pihlaja, K.. 1997. Estimation of origin of Lignin in Humic DOM by CuO-oxidation. *Chemosphere*, 35: 809-817.
- [14] – Maman, O., Marseille, F., Guillet, B., Disnar, J.R., Morin P.. 1996. Separation of phenolic aldehydes, ketones and acids from lignin degradation by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 755: 89-97.
- [15] – Esteves, V.I, Lima, S.S.F, Lima, D.L.D, Duarte, A.C.. 2004. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. *Analytica Chimica Acta*, 513: 163-167.
- [16] – Meyers-Schulte, K.J., Hedges, J.I.. 1986. Molecular evidence for a terrestrial component of organic matter dissolved in ocean water. *Nature*, 321: 61-63.
- [17] – Guillén, D., Merello, F., Barroso, C.G., Bustamante, J.A. P.. 1997. Solid-phase extraction for sample preparation, in the HPLC analysis of polyphenolic compounds in “Fino” sherry wine. *J. Agric.Food Chem.*, 45: 403-406.
- [18] – Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Rios, J.J, Camacho, M. L-, Alcudia F., Cert, A.. 2001. Determination of phenols, Flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric.Food Chem.*, 49: 2185-2192.



- [19] – García, A.A., Grande, B.C., Gándara, J.S.. 2004. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of chromatography A*, 1054: 175-180.
- [20] – Site: [http://csnet.otago.ac.nz/cosc453/student\\_tutorials/principal\\_components.pdf](http://csnet.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf)
- [21] – Štěrbová, D., Matějček, D., Vlček, J., Kubáň, V.. 2004. Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Analytica Chimica Acta*, 513: 435-444.
- [22] – Sjöberg, G., Knicker, H., Nilsson, S.I., Berggren, D.. 2004. Impact of long term N fertilization on the structural composition of spruce litter and mor humus. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 609-618.
- [23] – Lobbes, J., Fitznar, H. P., Kattner, G.. 1999. High-Performance liquid chromatography of lignin derived phenols in environmental samples with diode array detection. *Anal. Chem.*, 71: 3008-3012.
- [24] – Javor, T., Buchberger, W., Faix O.. 2003. Capillary electrophoretic determination of lignin degradation products obtained by permanganate oxidation. *Analytica Chimica Acta*, 484: 181-187.
- [25] – Bonoli, M., Montanucci, M., Toschi, T. G., Lercker, G.. 2003. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1011: 163-172.
- [26] – Kronholm, J., Ruiz, P. R.-, Porras, S.P., Hartonen, K., Martínez, R. C.-, Riekkola, M.-L.. Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and capillary

electrophoresis in analysis of phenolic compounds extracted from solid matrices with pressurized hot water. *Journal of Chromatography A*, 1022: 9-16.

[27] – Kopplin, Ph. S., Garrison, A. W., Perdue, E. M., Freitag, D., Kettrup, A.. 1998. Capillary electrophoresis in the analysis of humic substances Facts and artefacts. *Journal of Chromatography A*, 807: 101-109.

[28] – “Guide to solid phase extraction – Bulletin 910” from Supelco – Sigma-Aldrich Co. 1998.

[29] – Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A.. “Principles of Instrumental Analysis”, Saunders College Publishing, 5<sup>th</sup> Edition, 1998.

[30] – Covaci, A., Voorspoels, S.. 2005. Optimization of the determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 827: 216-223.

[31] – Schumacher, B.A. “Methods for the determination of the total organic carbon (TOC) in soils and sediments”, Ecological Risk Assessment Support Center, Office of Research and Development, U.S Environmental Protection Agency, 2002.

[32] – Hedges, J.I, Clark, W.A., Cowie, G.L.. 1988. Organic matter sources to the water column and superficial sediments of a marine bay. *Limnol. Oceanogr.*, 33: 1116-1136.

[33] – Site: [http://www.criticanarede.com/cien\\_estatistica.html](http://www.criticanarede.com/cien_estatistica.html)

[34] – Esteves, V.I., Duarte, A.C.. 1997. Thermogravimetric properties of aquatic humic substances. *Marine Chemistry*, 63: 225-233.

[35] – Ioselis, P., Rubinsztain, Y., Ikan, R., Aizenshtai, Z., Frenkel, M.. 1985. Thermal characterization of natural and synthetic humic substances. *Org. Geochem.*, 8: 95:101.

- [36] – Campanella, L., Tomassetti, M.. 1990. Thermogravimetric and IR analysis of different extracts of humic substances. *Thermochimica Acta*, 170: 67-80.
- [37] – Piccolo, A., Stevenson, F.J.. 1994. Infrared spectroscopy evidence of thermal decarboxylation in potassium salts of humic substances. *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. N. Senesi and T.M. Miano, Eds. Elsevier Science, Netherlands. 329-334.
- [38] – Pietro, M., Paola, C.. 2004. Thermal analysis for the evaluation of the organic matter evolution during municipal solid waste aerobic composting process. *Thermochimica Acta*, 413: 209-214.
- [39] – Calace, N., Cardellicchio, N., Petronio, B.M., Pietrantonio, M., Pietroletti, M.. 2006. Sedimentary humic substances in the northern Adriatic sea (Mediterranean sea). *Marine Environmental Research*, 61: 40-58.
- [40] – Rozenbaha, I., Odham, G., Järnberg, U., Alsberg, T., Klavins, M.. 2002. Characterization of humic substances by acid catalysed transesterification. *Analytica Chimica Acta*, 452: 105-114.
- [41] – Jones, M. N., Birkett, J. W., Wilkinson, A. E., Hesketh, N., Livens, F. R., Bryan, N. D., Lead, J. R., Hamilton-Taylor, J., Tipping, E.. 1995. Experimental determination of partial specific volumes of humic substances in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*, 314: 149-159.
- [42] – Casado-Vela, J., Sellés, S., Navarro, J., Bustamante, M.A, Mataix, J., Guerrero, C., Gomez, I.. 2006. Evaluation of composted sewage sludge as nutritional source for horticultural soils. *Waste management*, 26: 946-952.
- [43] – Smernik, R. J.. 2005. Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic studies of soil organic matter at two magnetic field strengths. *Geoderma*, 125: 249-271.

- [44] – Schilling, M.; Cooper, W. T.. 2004. Effects of chemical treatments on the quality and quantitative reliability of solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of mineral soils. *Analytica Chimica Acta*, 508: 207-216.
- [45] – Lorenz, K., Preston, C.M., Kandeler, E.. 2006. Soil organic matter in urban soils: Estimation of elemental carbon by thermal oxidation and characterization of organic matter by solid-state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Geoderma*, 130: 312-323.
- [46] – Dignac, M.F., Knicker, H., Kögel-Knabner, I.. 2002. Effect of N content and soil texture on the decomposition of organic matter in forest soils as revealed by solid-state CPMAS NMR spectroscopy. *Organic Geochemistry*, 33: 1715-1726.
- [47] – Ussiri, D.A.N., Johnson, C.E.. 2003. Characterization of organic matter in a northern hardwood forest soil by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and chemical methods. *Geoderma*, 111: 123-149.
- [48] – Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Esteves, V.I., Duarte, A.C., Fransozo, A., Soriano-Sierra, E.J.. 2005. Structural Description of Humic Substances from Subtropical Coastal Environments using Elemental Analysis, FT-IR and  $^{13}\text{C}$ -Solid State NMR Data. *Journal of Coastal Research*, 42: 370-382.
- [49] – Gonçalves, C.N., Dalmolin, R.S.D., Dick, D.P, Knicker, H., Klamt, E., Kögel-Knabner, I.. 2003. The effect of 10% HF treatment on the resolution of CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR spectra and on the quality of organic matter in Ferralsols. *Geoderma*, 116: 373-392.
- [50] – Esteves, Valdemar I.. 1995. *Extracção e Caracterização de Substâncias Húmicas de Diferentes Ambientes Aquáticos*. Teses de Doutorado. Universidade de Aveiro.
- [51] – Galantini, J., Rosell, R.. 2005. Long-term fertilization effects on soil organic matter quality and dynamics under different production systems in semiarid Pampean soils. *Soil & Tillage Research*. Article in Press.

- [52] – Polak, J., Sulkowski, W.W., Bartoszek, M., Papiez, W.. 2005. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic acid extracted from sewage sludge. *Journal of Molecular Structure*, 744-747: 983-989.
- [53] – Calace, N., Cardellicchio, N., Petronio, B.M., Pietrantonio, M., Pietroletti, M.. 2006. Sedimentary humic substances in the northern Adriatic sea (Mediterranean sea). *Marine Environmental Research*, 61: 40-58.
- [54] – Rumpel, C., Rabia, N., Derenne, S., Quenea, K., Eusterhues, K., Kögel-Knabner, I., Mariotti, A.. 2006. Alteration of soil organic matter following treatment with hydrofluoric acid (HF). *Organic Geochemistry*. Article in Press.
- [55] – Santos, Maria Eduarda Bastos Henriques dos. 1994. *Extracção, Caracterização e Comportamento Ácido-Base de Substâncias Húmicas Aquáticas*. Tese de Doutoramento. Universidade de Aveiro.
- [56] – Shirshova, L.T., Ghabbour, E.A., Davies, G..2006. Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures. *Geoderma*, 133: 204-216.
- [57] – Hafidi, H., Amir, S., Revel, J.C.. 2005. Structural characterization of olive mill waster-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and  $^{13}\text{C}$  NMR. *Process Biochemistry*, 40: 2615-2622.
- [58] – Kuhn, R., Hoffstetter-Kuhn, S., “Capillary Electrophoresis: Principles and Practice”, Springer-Verlag, 1<sup>st</sup> Edition, 1993.
- [59] – Foret, F., Křivánková, L., Boček, P., “Capillary Zone Electrophoresis”, VCH, 1<sup>st</sup> Edition, 1993.